

03068
6
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

**“EXPRESION DEL GEN DE LA PROLACTINA (PRL)
EN CELULAS ENDOTELIALES DE RETINA DE RATA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A:

LIC. EN I.B.B. ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

ASESOR: DR. GONZALO MARTINEZ DE LA ESCALERA

JURIQUILLA, QRO. 1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

26 03 68



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el Centro de Neurobiología de la U.N.A.M., bajo la asesoría del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera y con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

*A Pável, por compartir conmigo
este reto del que tanto hemos aprendido*

AGRADECIMIENTOS

A Carmen y Gonzalo por su apoyo y ayuda en todo momento.

A la Dra. Carmen Aceves y al Dr. Rogelio Arellano por los valiosos comentarios durante el desarrollo y la culminación de este trabajo.

A Rosi, Josefina y Xóchitl por el apoyo y cariño que me han brindado en esta nueva etapa de mi vida, con los cuales continúo creciendo.

A mi papá y a Zara por contribuir de manera especial en lo que soy ahora.

A mis amigos: los que siempre estarán, los que fueron, los que llegaron y los que están por venir.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio por colaborar de alguna forma en este trabajo, pero sobre todo por su amistad.

A la Universidad una vez más.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESÚMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
La angiogénesis	4
La Prolactina	9
<i>La Prolactina en la Angiogénesis</i>	10
La Retina	12
<i>La Retina y la Angiogénesis</i>	12
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
GENERAL	
PARTICULARES	
MATERIALES Y MÉTODOS	16
I.- Cultivo celular	16
II.- Inmunocitoquímica	19
III.- Unión a las lectinas: UEA-I y BS-I	20
IV.- Ensayos de proliferación	20
V.- Formación de capilares sobre geles de colágena	21
VI.- Extracción del ARN, retrotranscripción y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	22
VII.- Análisis de Southern Blot	23
RESULTADOS	24
I.- Obtención del cultivo celular	24

II.- Caracterización del cultivo como endotelio	24
III.- Determinación de la expresión de PRL	26
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

RESÚMEN

Se ha observado que moléculas pertenecientes a la familia de la prolactina (PRL) tienen efectos directos sobre las células endoteliales y efectos *in vivo* sobre la formación de vasos sanguíneos nuevos (angiogénesis). Evidencias recientes muestran que el gen de la PRL se expresa en células endoteliales bovinas y humanas. En este trabajo se muestra la expresión de la PRL en un cultivo endotelial de retina de rata. Para poder cumplir con este objetivo se extrajeron retinas de rata, las cuales se sembraron sobre fibronectina en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino, heparina y factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) a una concentración de 2 ng/ml. Posteriormente se clonaron las células que adquirieron apariencia de "empedrado". La caracterización del cultivo como endotelio se realizó con base en los siguientes parámetros: la formación de monocapas, la inhibición de la proliferación por contacto, la formación de estructuras tipo capilar en geles de colágena, la inmunotinción positiva al factor von Willebrand, la unión a las lectinas UEA-I y BS-I y la proliferación de manera dosis respuesta ante el estímulo del bFGF y del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). La determinación de la expresión de PRL por el cultivo de la retina de rata se realizó mediante el análisis de Southern blot y la inmunotinción positiva a un anticuerpo policlonal anti-PRL 23 K. Los resultados obtenidos en este estudio permitirán explorar la función que ejerce la PRL sobre la angiogénesis en la rata.

INTRODUCCIÓN

La angiogénesis o formación de vasculatura nueva es un evento cuyo estudio ha cobrado gran interés, ya que está asociada con diversas patologías y, de igual forma, se presenta en ciertas condiciones fisiológicas. Dado que es un proceso altamente regulado, es importante encontrar los factores inhibidores y estimuladores de la angiogénesis, así como desarrollar modelos en los que su estudio pueda llevarse a cabo. Es en esto último en lo que radica el objetivo del presente trabajo.

La Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso mediante el cual se forman vasos sanguíneos nuevos a partir de vasos ya existentes. Este proceso reside principalmente en la función de las células endoteliales que conforman el lumen de los vasos y de los capilares (Auerbach, W. y Auerbach, R. 1994). La función de este endotelio está involucrada en procesos fisiológicos importantes, ya que promueve el intercambio de metabolitos y de productos de secreción entre la sangre y los tejidos, además participa en la regulación de la vasoconstricción y la vasodilatación. La manera mediante la cual las células endoteliales se unen unas a otras puede variar dependiendo del grado de intercambio requerido entre los tejidos y la sangre. Así por ejemplo, al endotelio se le clasifica en: 1) discontinuo, el que presenta una alta permeabilidad como ocurre en el hígado o en el vazo; 2) fenestrado, con un menor grado de filtrado, por ejemplo el que se encuentra en los túbulos renales; y 3) continuo, que muestra una permeabilidad escasa. Un ejemplo de endotelio continuo se encuentra en los capilares del cerebro o de la retina donde las células endoteliales se asocian entre sí mediante uniones estrechas, limitando de esta manera el tráfico de moléculas entre la sangre y las células (Rubin, L., 1992, Risau, W., 1995 y Gerritsen, M.E., 1987).

En el desarrollo embrionario de los mamíferos y de las aves, los vasos sanguíneos comienzan a aparecer en el saco vitelino. Estos vasos primitivos se originan a partir de los llamados islotes sanguíneos, los cuales están formados en su centro por células precursoras de las células de la sangre (hemoblastos), y en su periferia por células precursoras de las células endoteliales, llamadas

angioblastos (Augustin, H.G. y colaboradores, 1994; y Risau, W., 1995). La formación de los vasos sanguíneos a partir de los angioblastos se conoce como vasculogénesis. Los subsecuentes procesos involucrados en la formación de la red vascular durante los estados embrionario y fetal, están dados principalmente por la angiogénesis. En esta etapa de formación de neovasculatura, las células endoteliales se encuentran en un alto estado proliferativo que en el adulto ya no se presenta. Se ha estimado que en un macho mamífero adulto, menos del 0.1% de las células endoteliales se encuentran en un ciclo de división celular, siendo uno de los tipos celulares con vida más larga (Auerbach, W. y Auerbach, R., 1994; Hanahan, D. y Folkman, J., 1996). En los mamíferos podemos encontrar a la angiogénesis de manera normal en procesos como la ovulación, la menstruación, la implantación o el embarazo. Este evento se presenta también normalmente durante la reparación tisular (Folkman, J. y Shing, Y. 1992). Fuera de estas condiciones, las situaciones en las que se presenta la angiogénesis en el adulto son patológicas. Un ejemplo de lo anterior es la artritis, en la que múltiples capilares invaden la articulación y destruyen al cartílago; o bien, la diabetes, donde una profusa neovascularización invade la retina e incluso el vítreo, causando ceguera. Finalmente durante el crecimiento de tumores sólidos y la aparición de metástasis también la angiogénesis está presente (Hanahan, D. y Folkman, J., 1996; Folkman, J. y Shing, Y. 1992; Folkman, J. y Klagsbrun, M., 1987).

Para su estudio, el proceso angiogénico ha sido dividido en cuatro fases. La primera de ellas está caracterizada por la presencia de discontinuidad vascular en la que se degrada la membrana basal que rodea a las células endoteliales a través de enzimas específicas. En esta fase también se puede presentar destrucción de las células endoteliales (citólisis). La segunda fase de la angiogénesis se presenta la migración de las células endoteliales. En esta etapa se puede observar un fenómeno de quimiotaxis en el cual las células migran al ser estimuladas por algún factor liberado en forma local o extravascular. La quimioatracción también está presente en esta fase y en este fenómeno las células migran dirigidas por factores que son liberados en gradiente y de manera local. Durante este periodo la adhesión de las células con la matriz extracelular es necesaria para el movimiento. Al mismo tiempo que ocurre la migración, las células proliferan y se alinean una con otra para formar el nuevo vaso, este evento constituye la tercera fase de la angiogénesis. Finalmente, la cuarta etapa angiogénica comprende la organización tridimensional de las células, en donde la curvatura de las mismas forma el lumen del vaso. El proceso angiogénico termina con la formación de una nueva

membrana basal (Auerbach, W. y Auerbach, R., 1994 y Folkman, J. y Shing, Y., 1992). En el Diagrama 1 se esquematizan estos eventos.

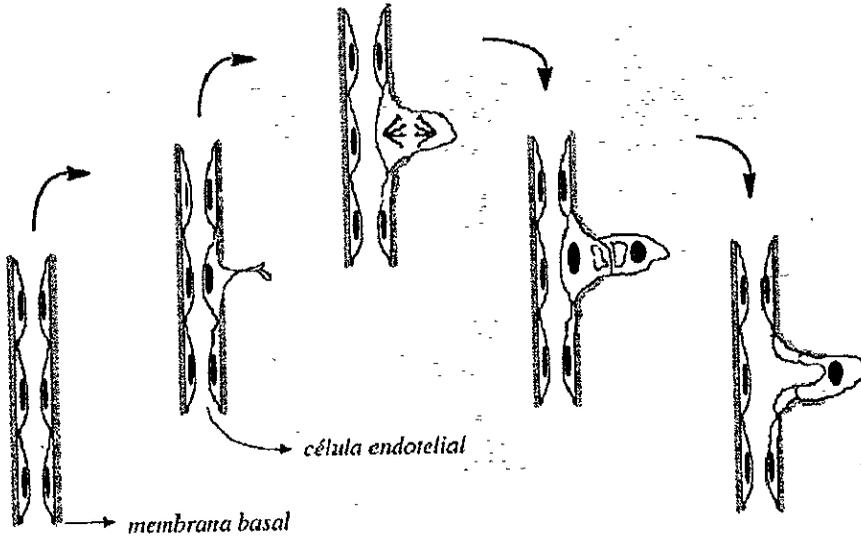


DIAGRAMA 1.- Distintas fases del proceso angiogénico.

El hecho de que las células endoteliales en el adulto presenten una baja tasa de proliferación, sugiere que existe un predominio de los factores que inhiben al proceso angiogénico con respecto a los que lo estimulan (Auerbach, W. y Auerbach, R., 1994). Muchos de estos factores son producidos por las propias células endoteliales, pero también pueden producirse en algún tejido lejano al endotelio o en otros tipos celulares vecinos como los fibroblastos, los macrófagos o los linfocitos (Hughes, C.C. y cols., 1990). La caracterización de factores reguladores de la angiogénesis se ha logrado observando el efecto que ejercen en una o en varias de las fases de la angiogénesis descritas

anteriormente, o bien por su efecto sobre todo el proceso angiogénico utilizando modelos *in vivo*, como lo son el modelo de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (CAM), el modelo de neovascularización de la córnea o los nuevos modelos de inhibición de la neovascularización tumoral e inhibición de las metástasis (O'Reilly, M.S. y colaboradores, 1994 y 1997.). El efecto de estos factores puede ser directo, es decir que estimulen *per se* la proliferación o migración de las células endoteliales, o bien indirecto, cuando se detecta el efecto *in vivo*, pero al probarse *in vitro* sobre células endoteliales no se observa respuesta, por lo que dicho efecto puede deberse a una multitud de factores como lo pueden ser los eventos desencadenados por células intermediarias (Folkman, J. y Shing, Y. 1992).

En la Tabla 1, se presentan algunos los factores más importantes reguladores de la angiogénesis, y se indica el tipo regulación que ejercen:

Tabla 1.- Principales moléculas reguladoras de la angiogénesis

Factor	Efecto sobre la angiogénesis	Referencia
Factor de crecimiento de fibroblastos ácido y básico (aFGF y bFGF)	Incrementa la proliferación. Estimula la migración. Estimula la formación de tubos. Incrementa la producción de proteasas y de activador de plasminógeno. Efecto <i>in vivo</i> .	Folkman, J. y Shing, Y. 1992; Folkman, J. y Klagsbrun, M., 1987.
Factor de crecimiento de endotelio vascular o factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF).	Mitógeno específico para células endoteliales <i>in vitro</i> Estimula la angiogénesis en modelos <i>in vivo</i> .	Ferrara, N. y colaboradores, 1991; y Dvorak, H.F. y colaboradores, 1995.
Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF)	Estimula la quimiotaxis. Incrementa la síntesis de DNA. Estimula la proliferación.	Folkman, J. y Shing, Y. 1992.
Factor de crecimiento transformante α (TGF- α) y el factor crecimiento epidérmico (EGF)	Incrementan la proliferación de células endoteliales microvasculares <i>in vitro</i> . Efecto angiogénico <i>in vivo</i> .	Folkman, J. y Klagsbrun, M., 1987.
Factor de crecimiento transformante B (TGF-B)	<i>In vivo</i> estimula la neovascularización. <i>In vitro</i> inhibe la proliferación de células endoteliales.	Folkman, J. y Klagsbrun, M., 1987.
Angiogenina	Efecto angiogénico <i>in vivo</i> . No estimula la proliferación de las células endoteliales.	Folkman, J. y Klagsbrun, M., 1987.
Prostaglandinas 1 y 2 (PGE ₁ y PGE ₂)	Efecto angiogénico <i>in vivo</i> . No estimula la proliferación de las células endoteliales.	Folkman, J. y Klagsbrun, M., 1987.
Trombospondina-1 (TSP-1)	Inhibidor de la angiogénesis <i>in vivo</i> .	Good, D.J. y colaboradores, 1990.
Angiostatina	Inhibidor de la angiogénesis <i>in vivo</i> .	O'Reilly, M.S. y colaboradores, 1994.
Endostatina	Inhibidor de la angiogénesis <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	O'Reilly, M.S. y colaboradores, 1997.
Interferon α (IFN- α)	Inhibidor de la angiogénesis <i>in vivo</i> .	Hughes, C. y colaboradores, 1990.
Interleucina 2 (IL-2)	Estimulador de la angiogénesis <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	Cozzolino, F. y colaboradores, 1993.
Interleucina 12 (IL-12)	Inhibidor de la angiogénesis <i>in vivo</i> .	Voest, E.E. y colaboradores, 1995.
Prolactina (16 kD) (PRL 16K)	Inhibidor de la angiogénesis <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	Clapp, C. y colaboradores, 1993.
Proliferina (PLP)	Estimulador de la angiogénesis <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Jackson, D. y colaboradores, 1994.
Proteína relacionada a la PRL (PRP)	Inhibidor de la angiogénesis <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	Jackson, D. y colaboradores, 1994.

Como se puede apreciar en la parte inferior y sombreada de la Tabla 1, tres moléculas pertenecientes a la familia de la Prolactina (PRL) se han

relacionado con la angiogénesis. Con base en lo anterior, y antes de profundizar en la regulación que ejercen algunas de las prolactinas sobre el proceso angiogénico, es importante situar a esta familia de hormonas dentro de un contexto general:

La Prolactina

La PRL es una de las hormonas más versátiles que se conocen, ya que se ha observado que está relacionada con más de 200 funciones distintas, y se ha detectado en una gran variedad de tejidos (Sinha, Y., 1995 y Nicoll, C.S., 1980). La PRL está involucrada con la regulación de eventos de la reproducción, del balance de fluidos, del crecimiento, del metabolismo, de la inmunomodulación, e incluso se la ha asociado con ciertos tipos de cáncer y con enfermedades autoinmunes. De igual forma, los sitios de expresión y producción de la misma se han reportado en el sistema endocrino, en el SNC, en el sistema inmune (SI), en el útero y en la glándula mamaria. Esta diversidad en función y síntesis hacen de la PRL una hormona con funciones reguladoras autocrinas, paracrinas y endocrinas (Clapp, C. y Martínez de la Escalera, G., 1997, y Clapp, C. y colaboradores, 1993). La versatilidad que presenta se explica, al menos en parte, con base en el hecho de que se puede encontrar en varias formas moleculares resultantes de modificaciones postranscripcionales y postraduccionales. Esta hormona se encuentra altamente conservada dentro de la escala filogenética de los vertebrados, y en diversas especies se han reportado variantes glicosiladas, fosforiladas, agregadas, o productos resultantes de cortes enzimáticos (Sinha, Y., 1995). Por ejemplo, Mitra, I. (1980) describe en la hipófisis de la rata la presencia de una PRL cortada (cPRL) entre los residuos de aminoácidos Tirosina 145 y Leucina 146, la cual se puede fragmentar en PRL 16 K, correspondiente al fragmento amino-terminal, y en la PRL 7 K, correspondiente al fragmento carboxilo-terminal por medio de una reducción de los puentes disulfuro.

La diversidad funcional y molecular de la PRL se conoce más en la rata que en otras especies. En esta especie la proteína madura producida en la adenohipófisis está constituida por 197 residuos de aminoácidos, con un peso molecular aproximado a los 23 000 daltones (Gubbins, E. y colaboradores, 1980). Se ha reportado en esta especie la existencia de variantes moleculares de la PRL generadas por modificaciones postranscripcionales. Dentro de éstas, existen variantes generadas por edición alternativa del gen. La edición

alternativa es un proceso que permite la generación de distintas isoformas de proteínas a partir de un gen (Alberts, B. y colaboradores, 1994). En la rata la transcripción completa del gen de la PRL genera un ARN mensajero (ARNm) de aproximadamente 823 pares de bases, producto de la expresión de los cinco exones que lo conforman. Se ha encontrado que en esta especie se generan productos resultantes de la edición alternativa que carecen de la expresión del exón 4 y cuyo tamaño es de aproximadamente 333 pares de bases. Esta variante molecular de la PRL se ha detectado en el hipotálamo, en regiones cerebrales extrahipotalámicas y en la hipófisis (Fields, K. y colaboradores, 1993, y Emanuele, N.V., y colaboradores, 1992).

Otro aspecto que le da heterogeneidad funcional a la PRL son los distintos receptores (PRLR) que median sus efectos. En la rata se ha reportado la presencia de tres diferentes receptores para esta hormona, los cuales presentan características que los ubican dentro de la superfamilia de receptores para citocinas-hormona de crecimiento (GH)/PRL (Lebrun, J.J. y colaboradores, 1995). Los PRLR presentan un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico. Difieren entre sí en la longitud del dominio citoplásmico y por lo tanto en la transducción de señales acoplada al mismo (Lebrun, J.J. y colaboradores, 1995). Se les ha clasificado en la isoforma larga, corta y Nb2, ya que esta última variante solo se ha encontrado en esta línea de linfoma de rata. La variante corta del receptor es generada por edición alternativa del último exón del gen que los codifica (Lebrun, J.J. y colaboradores, 1995). Se ha reportado la expresión tejido-específica de estos receptores y de igual forma, diferencias en la afinidad que presentan por las distintas variantes de la PRL (Sinha, Y., 1995).

La Prolactina en la Angiogénesis

El estudio de la función de la PRL sobre el proceso angiogénico comenzó al tratar de elucidar la participación de esta hormona en la formación de la nueva vasculatura desarrollada en prolactinomas inducidos por estradiol. En estos primeros estudios (Ferrara, N. y colaboradores, 1991) se demostró que la PRL 16 K, pero no la PRL completa o la cPRL, inhibe de manera dosis-dependiente la proliferación basal, así como aquella estimulada por el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) de células endoteliales bovinas provenientes de cerebro o de corteza adrenal. Un trabajo posterior reforzó este hallazgo al demostrarse un efecto sobre el proceso global, ya que la PRL 16 K inhibe la angiogénesis en el modelo de la CAM, así como la formación de

vasos por células endoteliales de capilar de cerebro bovino (BBEC) sobre geles de colágena. En este mismo trabajo se mostró que el efecto antiangiogénico de la PRL 16 K se presenta en células endoteliales provenientes de la vena del cordón umbilical humana (HUVEC), ya que inhibe su proliferación estimulada por el bFGF (Clapp, C. y colaboradores, 1993). Actualmente a la PRL 16 K se le considera un potente factor antiangiogénico (Clapp, C. y Martínez de la Escalera, G., 1997; y Hanahan, D. y Folkman, J., 1997).

La expresión del PRLR conocido en el endotelio se ha buscado sin resultados positivos hasta la fecha. Sin embargo, se ha encontrado en las membranas de las BBEC un sitio de alta afinidad para la PRL 16 K, el cual es específico para la misma y difiere tanto en tamaño como en características cinéticas de los PRLR clonados, ya que no se desplaza esta unión con PRL 23 K o con el bFGF. Estos resultados sugieren la presencia de un receptor novedoso para la PRL 16 K en el endotelio, el cual no ha sido caracterizado hasta el momento (Clapp, C. y Weiner, R.I., 1992).

En los estudios iniciales sobre la cascada de señalización que desencadena la PRL 16 K en el endotelio se ha demostrado que esta hormona inhibe la activación de la Cinasa de Proteínas Activada por Mitógeno (MAPK) en BBEC estimuladas por el bFGF o el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (D'Angelo, G. y colaboradores, 1995). Se ha observado que la activación de la vía de la MAPK por el bFGF resulta en la activación de la transcripción de genes necesarios para la respuesta al bFGF, como pueden ser aquellos involucrados con la división celular (Friesel, R. y Maciag, T., 1995).

La participación en la angiogénesis de otras proteínas pertenecientes a la familia de la PRL también ha sido explorada como se aprecia en la parte inferior de la Tabla 1. El efecto *in vitro* de la proliferina (PLF) y de la proteína relacionada a proliferina (PRP) se ha demostrado sobre la migración de las BBEC, la primera con un efecto estimulador, y la segunda con un efecto inhibitorio. Un efecto de estas dos proteínas consistente con los datos *in vitro* se ha demostrado *in vivo* en un modelo de angiogénesis de la córnea del conejo (Jackson, D. y colaboradores, 1994). Asimismo, tanto la PLF como la PRP son capaces de desplazar la unión de la 16 K a la membrana de las BBEC (Clapp, C. y Weiner, R.I., 1992).

Por otra parte, datos inéditos generados en nuestro laboratorio, demuestran la expresión del ARNm de la PRL en BBEC y en HUVEC. De igual forma se ha observado que la adición de un anticuerpo anti-PRL 23 K en el medio de cultivo de estas células inhibe la proliferación estimulada por el bFGF, sugiriendo, de esta manera, que varias prolactinas pueden estar participando en la regulación de la angiogénesis con distintos efectos.

El estudio de la angiogénesis *in vitro* se lleva a cabo empleando diversas fuentes de células endoteliales, ya sea vena, capilar o arteria, siendo de particular interés los órganos o tejidos en los que se podrían presentar patologías, como es el caso de la retina. Dado que uno de los resultados principales de este trabajo fue la obtención de un cultivo de endotelio de retina en la siguiente sección se presenta un resumen de las características de este tejido.

La retina

En la retina se lleva a cabo el procesamiento neural de las señales visuales. Por su composición celular, a la retina se le considera parte del Sistema Nervioso (SN). En el Diagrama 2 se muestran los componentes celulares de esta estructura.

El paso de la luz por la retina dentro del proceso general de la visión se puede explicar de la siguiente manera: la luz pasa a través de la córnea, el cristalino, el vítreo, para finalmente llegar a la retina. Aquí es donde, después de pasar por todas las capas celulares la luz se absorbe por los pigmentos visuales de los conos y los bastones mediante un proceso fotoquímico. Al pigmento de los bastones se le conoce como rodopsina, mientras que al de los conos se le llama pigmento de "color". Ambos pigmentos al excitarse incrementan la conductancia del Ca^{2+} , promoviendo de esta forma la liberación del mismo hacia el espacio intracelular en donde actúa sobre la membrana celular reduciendo la permeabilidad al Na^{2+} y provocando una hiperpolarización. Esta señal se transmite "de regreso" a las células bipolares, después a las ganglionares que generan potenciales de acción a lo largo de sus axones y conducen la información hacia el SNC (Yoshitomi, K. y Boorman, G.A., 1990; Kandel, E.R. y colaboradores, 1991; Guyton, A., 1991).

La Retina y la Angiogénesis

La retina recibe el aporte sanguíneo mediante la arteria retiniana central, la cual entra al globo ocular junto con el nervio óptico y luego se divide para irrigar a toda la superficie retiniana interna. Esto hace que la retina tenga, en gran medida, su propio riego sanguíneo independiente de otras estructuras del ojo (Guyton, A., 1991).

El proceso angiogénico, fuera del desarrollo embrionario, se presenta de manera patológica en la retina y casi siempre se le asocia con la no-perfusión capilar. Estos eventos se presentan en respuesta a un medio carente de oxígeno (hipoxia). La hipoxia es un proceso que se encuentra en enfermedades tales como la retinopatía diabética o la retinopatía del prematuro. En el caso de la diabetes, se cree que la causa de neovascularización es la no-perfusión capilar característica de la enfermedad, mientras que en la retinopatía del prematuro la formación de vasos sanguíneos nuevos se explica por la exposición a altas concentraciones de oxígeno en el momento del nacimiento, la cual induce vasoconstricción y que da como resultado una destrucción de los vasos retinianos inmaduros. La angiogénesis en la retina ocasiona hemorragia del vítreo y/o un desprendimiento de retina, el cual puede causar ceguera (Pe'er, J. y cols., 1994; Su, T. y Gilles, M.C., 1992 y Murata, T. y cols., 1996).

Con lo anterior se desprende la importancia de encontrar factores reguladores de la angiogénesis retiniana. Hasta el momento no se ha reportado que proteínas pertenecientes a la familia de la PRL participen en este proceso.

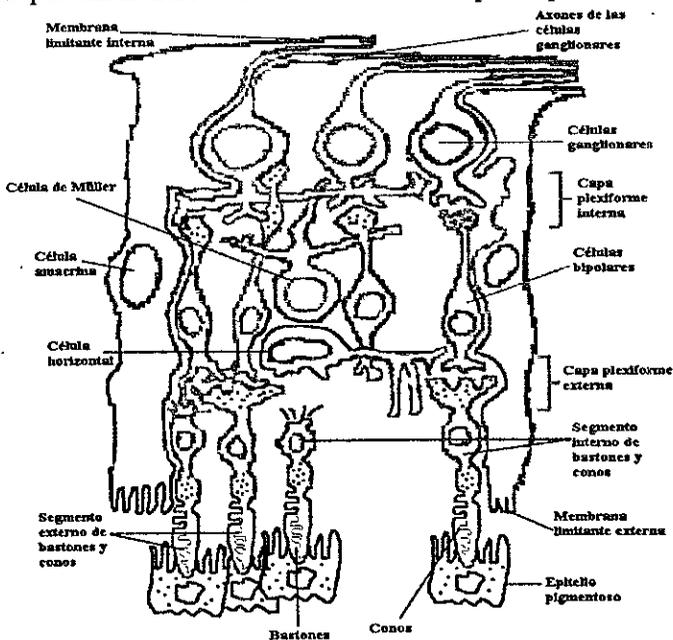


DIAGRAMA 2.- Representación esquemática de las capas de la retina (tomado de Yoshitomi, K. y Boorman, G., 1990).

HIPÓTESIS

Con las evidencias que se tienen hasta este momento y tomando en cuenta la ventaja que representa el modelo de la rata en relación a su fácil manipulación y acceso comparándolo con las células endoteliales bovinas o las humanas, se propone valorar si:

“La PRL es producida como un factor autócrino por las células endoteliales de rata”

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si las células endoteliales de la rata expresan al gen de la PRL.

PARTICULARES

- 1.- Desarrollar y caracterizar un cultivo primario de las células endoteliales de la rata.
- 2.- Determinar la expresión del gen de la prolactina en estos cultivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- Cultivo celular

Para poder cumplir con los objetivos propuestos en el presente trabajo concernientes a la obtención de un cultivo endotelial de rata, se utilizaron diversos métodos y estrategias que se describen a continuación:

Métodos empleados para aislar células endoteliales de rata

1.- Extracción de las células endoteliales de los capilares de corteza cerebral

De acuerdo con la técnica descrita por Gerritsen, M.E. y colaboradores (1988), se disecó la corteza cerebral asépticamente de 5 ratas macho jóvenes Wistar (200 g). La corteza se cortó en fragmentos pequeños y se colocó en Medio 199 (M199, Gibco) con 5% de suero de ternera (BCS, Gibco). Posteriormente el tejido se homogeneizó con un homogeneizador manual de vidrio-vidrio. El homogenado se centrifugó a 100 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en M199 con 15% de Dextran de 146 kilodaltones (Sigma), se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos para resuspender el sedimento en M199 con 5% de BCS. Se preparó una columna con esferas de vidrio de un diámetro de 0.025 a 1 mm (Sigma) en jeringas de 5 ml. La suspensión se añadió a la columna, la cual se lavó con 50 ml de M199 con 5% de BCS. La columna se decantó en 15 ml. de medio, y se agitó en un vortex para despegar la microvasculatura de las esferas de vidrio. Se centrifugó el medio con la microvasculatura a 4000 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en una solución de Colagenasa tipo II (Worthington) a una concentración de 1 mg/ml en amortiguador de fosfatos (PBS) con albúmina sérica bovina (BSA) al 1%. La digestión con la enzima se realizó durante 30 minutos a 37 °C con agitación. Se añadió un volumen de la digestión a 0.5 volúmenes de PBS en 6% de BSA. La suspensión se centrifugó a 100 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en M199 con suero derivado de plasma humano al 15-20% (donado por el Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea), 100 U/ml de penicilina-estreptomicina (Gibco), 2.5 µg de fungizona (Gibco) y 5 µl/ml del factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF, Sigma). Las células se sembraron en cajas cubiertas con 10 µg/ml de fibronectina de plasma humano (FN, Gibco) y se incubaron a 37 °C durante 1

hora en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Al final de la incubación el medio de cultivo se reemplazó para quitar las células no adheridas.

2.- Extracción del endotelio cardíaco:

Se extrajeron corazones de siete ratas macho Wistar de 300 g de peso aproximadamente. Los corazones se colocaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) alto en glucosa (Gibco) frío con 1% de penicilina-estreptomina y 2.5 µg de fungizona. Se realizó un corte sagital en el ventrículo izquierdo, y los corazones se dejaron incubando con Colagenasa tipo I (1 mg/ml, Worthington) durante 5-10 minutos en DMEM con antibióticos y fungizona. Posteriormente se colocaron en una caja de petri de 100 mm (Costar) con DMEM y suero fetal bovino (FBS, Gibco) al 15%, y con una espátula se raspó el endotelio. A las células se les añadió el bFGF (Gibco) a una concentración de 2 ng/ml. El medio se reemplazó a las 24 horas del cultivo.

3.- Extracción de las células endoteliales de la vena umbilical:

Se utilizó una hembra Wistar adulta con embarazo a término. Se extrajo el útero con los embriones, y se colocó en medio de Hank's (Gibco) con antibióticos. Cada uno de los embriones se sacaron del saco amniótico y se identificó la vena del cordón umbilical. Una vez disecada la vena se canuló con una jeringa de insulina y se reforzó la canulación con pinzas hemostáticas. La vena se lavó con PBS con antibióticos y posteriormente se cerraron los extremos proximal y distal de la misma con hilos. Se inyectó tripsina-EDTA en la vena (Gibco), la cual se dejó incubando durante 12 minutos a 37 °C. Posteriormente se retiraron los hilos de la vena y la tripsina se vació sobre FBS al 10%. Las células despegadas se centrifugaron y se resuspendieron en F12K (Gibco) con antibióticos y FBS al 10%. Las células se sembraron sobre platos cubiertos con FN y al medio se le añadió el suplemento para el crecimiento de células endoteliales (ECGS, Sigma) a una concentración de 40 µg/ml y el bFGF (10 ng/ml). El medio se reemplazó a las 24 horas del cultivo.

4.-Extracción y cultivo de las células endoteliales de la retina

Se disecó el globo ocular de 5 ratas hembras jóvenes Wistar (200 g de peso aproximadamente). Con una jeringa se extrajo el humor vítreo de la cámara posterior del ojo y se añadió sobre el plato de cultivo. Posteriormente se cortó la córnea, se removió el cristalino y con unas pinzas se desprendió la

retina, la cual se cortó en fragmentos pequeños que se sembraron sobre los platos cubiertos con FN y con el humor vítreo con el siguiente medio de cultivo: DMEM con 100 mg/ml de Heparina (Gibco), con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina-estreptomicina y 2 ng/ml del bFGF. Los cultivos se incubaron a 37°C en una atmósfera compuesta por 5% de CO₂ y 95% de H₂O. Esta técnica está basada en la descrita para extracción de retinas de conejos por Koyama, N. y colaboradores (1994). Las células no adheridas se lavaron cada 12 horas y el explante de la retina se dejó durante 72 horas. Las colonias formadas se “clonaron” con un fragmento de una pipeta Pasteur, la cual funcionó como un anillo de clonación. Se añadió tripsina únicamente en la región del plato en la que se encontraban las células que se deseaban despegar, y se pipeteó con una micropipeta varias veces. Una vez despegadas las células, se sembraron sobre placas de 48 pozos (Costar) cubiertas con FN. A las 3 horas se retiraron las células no adheridas. El medio se reemplazó cada 24 horas. Las células se fotografiaron mediante microscopía de contraste de fases con un microscopio invertido Nikon TMS con una cámara Nikon AFX-IIA, y con un aumento de 200X, al que se le multiplica por un factor de 3.6 que es el aumento de las fotografías. Las células utilizadas para los diferentes experimentos se encontraban entre los pasajes 4-15 (p4-p15).

Cultivo de fibroblastos y células GT1

Los fibroblastos extraídos de la piel de la rata, la línea de fibroblastos murina 3T3 y las células GnRHérgicas GT1-7, se sembraron en el siguiente medio de cultivo: DMEM con 10 000 U de penicilina-estreptomicina y 10% de suero fetal bovino.

Cultivo de las células GH4

La línea de lactotropos GH4 se cultivó en medio F10 (Gibco) con 10 000 U de penicilina-estreptomicina y 10% de suero fetal bovino

Cultivo de las células endoteliales de la vena del cordón umbilical (HUVEC)

Las células HUVE extraídas previamente en el laboratorio, se sembraron sobre placas cubiertas con FN en F12K con 10 000 U de penicilina-

estreptomycin, 10% de suero fetal bovino y ECGS a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$.

II.- Inmunocitoquímica

Para caracterizar el cultivo obtenido se utilizó un anticuerpo monoclonal en contra de la proteína von Willebrand humana, o bien otro policlonal en contra de la rPRL 23 K (S9). La detección indirecta para ambas proteínas se realizó a través de segundos anticuerpos acoplados a isotiocianato de tetrametilrhodamina (anti-IgG ratón-TRITC o anti-IgG conejo-TRITC, respectivamente; Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., Pennsylvania, U.S.A.). El procedimiento general de la inmunotinción fue el siguiente:

- 1.- Las células de la retina clonadas o las células control se sembraron sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina (10 $\mu\text{g/ml}$) y se les añadió el medio de cultivo correspondiente.
- 2.- Una vez que las células alcanzaron el 60-80% de confluencia se retiró el medio y se lavaron con PBS frío de pH 7.4.
- 3.- Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación se lavaron con PBS frío tres veces.
- 4.- Se añadió Suero Normal de Cabra (Sigma Immunochemicals) para bloquear sitios de pegado inespecíficos diluido 1:10 en PBS-tritón al 0.3% y BSA al 2% y se dejó incubando con las células durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda. Las células se lavaron cuatro veces con PBS-tritón al 0.3% y BSA al 2%.
- 5.- Se añadió el anticuerpo monoclonal anti-proteína von Willebrand humana (Accurate Chemical and Scientific Corporation) diluido 1:500 en PBS-tritón al 0.3% y BSA al 2%, o bien el anticuerpo anti-rPRL S9 (donado por Berger) diluido 1:1000, y se dejaron incubando 4 horas a 37 °C. Las células se lavaron cuatro veces con PBS-tritón al 0.3% y BSA al 2%. Para el caso de la inmunotinción a la proteína von Willebrand se utilizó un control sin primer anticuerpo; para el caso de la rPRL 23 K además de este mismo control, se utilizó otro con suero preinmune (Jackson Immunoresearch) diluido 1 :1000.

6.- Se añadió a los cubreobjetos el segundo anticuerpo anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo acoplados a TRITC a una concentración de 13 mg/ml en PBS-tritón al 0.3% y se dejaron incubando durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Las células se lavaron cuatro veces con PBS-tritón al 0.3% y BSA al 2% y luego una vez con PBS solo.

7.- Los cubreobjetos se montaron con glicerol-PBS (1:1) en el portaobjetos y se observaron y fotografiaron en un microscopio con epifluorescencia Nikon Optiphot.

III.- Unión a las lectinas: aglutinina *Ulex europaeus* I (UEA-I) e isolectina *Bandeiraea simplicifolia* I (BSI)

Las células de la retina clonadas o las células control se sembraron sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina (10 µg/ml) y se les añadió el medio de cultivo correspondiente. Una vez que las células alcanzaron el 60-80% de confluencia se retiró el medio, y las células se lavaron con PBS frío de pH 7.4. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la fijación, se lavaron con PBS frío tres veces. La incubación con UEA-I-TRITC (Sigma) se realizó durante treinta minutos a temperatura ambiente y la lectina se utilizó a una concentración de 100 µg/ml en PBS suplementado con 0.1 g/litro de CaCl y MgCl, de acuerdo con la técnica descrita por Holthöfer, H. y colaboradores (1982). La incubación con la lectina BSI-TRITC (Sigma) se realizó durante treinta minutos a temperatura ambiente y esta se utilizó a una concentración de 25 µg/ml en PBS, como lo describen Magee, J.C. y colaboradores (1994). Después de la incubación con las lectinas las células se lavaron con PBS tres veces y los cubreobjetos se montaron al portaobjetos con PBS-glicerol. Las células se observaron y fotografiaron en un microscopio con epifluorescencia Nikon Optiphot.

IV.- Ensayos de proliferación

La tasa de proliferación de las células de la retina de rata se determinó mediante la incorporación de timidina tritiada (³H-T, Amershan International plc).

Para los ensayos con el bFGF, la rPRL 23K (obtenida del NIH), el anticuerpo S9 y el anticuerpo S9 coincubado con la rPRL 23 K se sembraron

10 000 células/pozo en placas de 24 pozos (Costar) en su medio correspondiente. Las células crecieron en ausencia del bFGF durante 96 horas previas al ensayo. Veinticuatro horas antes del mismo se les añadió el medio de cultivo correspondiente con 0.1% de FBS. El tiempo de incubación de los experimentos fue de 48 horas. Después de varios ensayos se determinó que el tiempo de pulsación de ^3H -timidina fuera de 20 horas con 500 000 cpm/pozo para las condiciones descritas anteriormente. La coincubación del S9 con la rPRL 23 K se realizó durante 16 horas previas al experimento con agitación a 4 °C. En ninguno de los casos anteriores se reemplazó el medio durante el experimento.

El ensayo de inhibición por contacto se realizó durante 24 horas, sembrando distintas concentraciones de las células en placas de 24 pozos en su medio de cultivo completo. El pulso de ^3H -T fue de 4 horas y se añadieron 500 000 cpm/pozo.

El ensayo de proliferación con el VEGF (donado por Napoleone Ferrara) se elaboró sembrando 12500 células/pozo en placas de 24 pozos en un sistema de cultivo libre de suero (SFMS, Gibco) suplementado con 10 ng/ml del factor de crecimiento epidérmico (EGF, Gibco). El ensayo duró 60 horas y el pulso de ^3H -T fue de 12 horas, añadiendo 500 000 cpm/pozo . Se reemplazó el medio con VEGF a las 48 horas del experimento.

La ^3H -T no incorporada por los cultivos se lavó con ácido tricloroacético (TCA) al 5% durante 20 minutos a 4°C. Después de esta incubación, las células se lavaron 3 veces con este reactivo. Para solubilizar el ADN marcado, se añadieron 0.5 ml de NaOH 0.25 N y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación. Finalmente el ADN marcado se colectó en viales de centelleo, añadiendo 3.5 ml de solución de centelleo (RPI, Mount Prospect, IL, USA) y la ^3H -T incorporada por las células se contó en un contador de emisiones B Beckman LS 6500.

Todos los ensayos anteriores se realizaron por triplicado. Tanto el bFGF, como la rPRL 23 K, el S9 y el VEGF se disolvieron en PBS con BSA al 0.1%.

V.- Formación de capilares sobre geles de colágena

Se modificó la técnica descrita por Montesano, R. y colaboradores (1983) de la siguiente manera: se tomaron 8 volúmenes de colágena Tipo I (Vitrogen 100), y se le añadió un volumen de PBS pH 7.4 10X y un volumen de NaOH 0.1 M. Con 300 µl de este gel se cubrieron platos de 24 pozos y se dejó polimerizar durante 10 minutos a 37 °C. Una vez gelificada la colágena,

se sembraron 200 000 células de la retina por pozo para obtener una monocapa subconfluente a los 2-3 días del cultivo. Después de este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se añadió el mismo volumen de la solución de colágena descrita anteriormente de manera que la monocapa de células quedara entre dos geles. Se añadió medio y como condición experimental el bFGF (2 ng/ml). La reorganización de la monocapa fue monitoreada y fotografiada mediante microscopía de contraste de fases con un microscopio invertido Nikon TMS utilizando una cámara Nikon AFX-IIA.

VI.- Extracción del ARN, retrotranscripción y amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El ARN total de las células se extrajo por un método de un solo paso en el que se utiliza el procedimiento de Chomczynski y Sacchi (1987). Las células se lisaron con 4 volúmenes de una solución de guanidina (4 M de tiocinato de guanidina (Sigma) 5% de sarcosinato lauryl de sodio (SDS, Sigma), 0.1 M de B-mercaptoetanol (Sigma) y 25 mM de citrato de sodio (Sigma) pH 7). El lisado se extrajo con fenol-cloroformo (Gibco y Sigma) y el ARN se precipitó con etanol.

La retrotranscripción se realizó utilizando 10 µg del ARN extraído, cuya concentración se determinó por absorbancia espectrofotométrica a 260 nm en el espectrofotómetro Beckman DU 650. Al ARN se le añadió el buffer de retrotranscripción compuesto por MgCl₂ 10X, la mezcla de nucleótidos 2 mM, el Oligo d(T), y la enzima RT MMTV. La reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C, y posteriormente a 95 °C durante 5 minutos. El ADN complementario (ADNc) obtenido se congeló a -20 °C. Todos los reactivos se obtuvieron de Gibco.

Una vez obtenido el ADNc, se amplificó mediante PCR con el siguiente buffer de reacción: mezcla de nucleótidos, Taq polimerasa y la siguiente combinación de oligonucleótidos específicos para el gen de la prolactina de rata: 5'-TGTTCTGGTGGCGACTGCCAGACACCT-3' del exón 2, en conjunto con otro que comprende la región 3'-GCCGAAG-AGCTTCCCTAGCTTTTCTAT-5' del exón 4. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer Geneamp 2400 bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos de amplificación que constan de 2 minutos 30 seg. a 95°C, 30 seg. a 94°C, 1 minuto a 65°C y 1 minuto 30 seg. a 72°C. Todos los reactivos de la amplificación se obtuvieron de Gibco.

VII.- Análisis de Southern Blot

Las muestras del ADNc se fraccionaron en geles al 1% de agarosa (Gibco) y formaldehído 1M (Sigma), y posteriormente se transfirieron a membranas de nylon (Hybon-NTM, Amersham) mediante capilaridad con un buffer de sales compuesto por citrato de sodio 0.3M y NaCl 3M a pH 7 (SSC). Los blots se hibridizaron con la sonda de la rPRL extraída con la enzima de restricción EcoRI (Gibco) del plásmido sp65, mediante una preparación a mediana escala utilizando el método de lisis mediante ebullición descrito por Sambrook, J. y cols. (1989), al que se le añadieron 100 mg de ARNasa (Boeheringer). La extracción del plásmido se realizó con fenol-cloroformo. Para obtener el fragmento correspondiente a la secuencia de la rPRL se separó el ADN del plásmido en un gel de agarosa-bromuro de etidio y se digirió con las enzimas de restricción adecuadas (EcoRI, Gibco). Posteriormente se cortó la banda deseada con ayuda de una lámpara de UV y mediante congelación en nitrógeno líquido se extrajo el fragmento añadiendo LiCl 4 M y precipitando posteriormente con fenol-cloroformo.

La sonda se marcó con (α - 32 P)deoxy-ATP (New England Nuclear) por el método de primeros al azar descrito por Feinberg y Vogelstein (1983). El blot se hibridizó durante toda la noche con la sonda a 42 °C y se lavó durante 20 minutos a temperatura ambiente con SSC 2X y SDS 0.1%. Posteriormente se realizaron tres lavados de SSC 0.1X y SDS 0.1% durante 20 minutos a 50 °C. El blot se dejó exponiendo en una película de rayos-X (Kodak X-OMAT) con una pantalla intensificadora a -70 °C.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de ANOVA para los casos en los que se compararon varios tratamientos y mediante prueba *t* de Student para los casos en los que se compararon dos tratamientos. En todos los casos se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

I.- Obtención del cultivo celular

Siguiendo las estrategias descritas en materiales y métodos para la extracción y cultivo de células endoteliales de rata, se aislaron cultivos primarios provenientes del endotelio cardíaco y de la vena umbilical de la rata, en los que no se observó proliferación. En contraste con lo anterior, utilizando la modificación del método descrito por Koyama, N. y colaboradores (1994) para la obtención de células endoteliales de retina de conejo, se lograron aislar cultivos de rata, los cuales se clonaron como se describe en la sección anterior y se crecieron para las posteriores pruebas de caracterización endotelial y determinación de la expresión de PRL.

En la Figura 1 se muestran las células de la retina de rata que lograron desprenderse, adherirse al plato de cultivo y proliferar aproximadamente a los 8 días del cultivo de la retina.

II.- Caracterización del cultivo como endotelio

1.- Formación de monocapas e inhibición de la proliferación celular por contacto

Una de las características del cultivo endotelial es la formación de monocapas confluentes. Cuando estas células se encuentran en una alta confluencia dejan de proliferar mediante un mecanismo de inhibición por contacto celular. Éstos son parámetros esperados para determinar el carácter endotelial de un cultivo. Como se puede apreciar en la Figura 2, las células de la retina forman una monocapa con apariencia de empedrado cuando se encuentran en una alta confluencia y cuando esto ocurre dejan de proliferar como se observa en la Figura 3, donde al incrementarse la densidad celular, la incorporación de ^3H -Timidina disminuye de manera significativa. La incorporación del radioisótopo es un indicador de la tasa de proliferación celular.

2.- Inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-von Willebrand

La inmunotinción de la proteína von Willebrand es otro de los parámetros más utilizados para la caracterización del endotelio. En la Figura 4B se observan las células de la retina de la rata que resultaron inmunopositivas para el anticuerpo policlonal en contra de la proteína von Willebrand a una dilución de 1:500 y marcado con TRITC. Se aprecia el citoplasma teñido y el núcleo bien definido. En la Figura 4A se observan las células HUVE utilizadas como control positivo en esta inmunotinción y en la Figura 4C se muestra el control sin primer anticuerpo para las células de retina, en el que no se aprecia tinción.

3.- Unión a las lectinas UEA-I y BS-I

Las células endoteliales expresan moléculas de superficie que han sido empleadas como marcadores específicos. Con base en esto se han desarrollado diversas técnicas de caracterización que se basan en el reconocimiento de estas moléculas. Un ejemplo es la unión de ciertas lectinas a azúcares de superficie específicos.

La unión de la lectina UEA-I se utiliza como un marcador selectivo de endotelio. Como se puede apreciar en la Figura 5, las células de los capilares de la retina son teñidas con esta lectina unida a un marcador fluorescente (5A), a diferencia de la línea de fibroblastos 3T3 (5B). Debido a la ubicación del azúcar, las células endoteliales se tiñen principalmente en la membrana celular.

La lectina BS-I es otro marcador selectivo de endotelio, que también se une a moléculas de superficie específicas. Los resultados detectados con esta lectina son similares a los observados con la UEA-I. La Figura 6A muestra que la unión de BS-I a las células de la retina es positiva, mientras que en los fibroblastos 3T3 no se observa tinción (Figura 6B).

4.- Formación de capilares en geles de colágena

Otro parámetro más que se utilizan para caracterizar al endotelio es la morfología que desarrolla cuando se encuentra en matrices de distinta composición, como los geles de colágena en los que las células endoteliales tienden a formar estructuras tridimensionales que semejan capilares. En los resultados aquí presentados se muestra que setenta y dos horas después de que las células se sembraron entre dos capas de geles de colágena Tipo I y en presencia del bFGF (2 ng/ml), las células comienzan a organizarse en cordones

tipo capilar como se aprecia en la Figura 7. Las células en ausencia de bFGF también se organizan en estructuras tipo capilar a los 6 días del cultivo (resultados no mostrados).

5.- Proliferación estimulada por el bFGF

La proliferación de las células endoteliales estimulada por diversos mitógenos también es considerada como un parámetro que ayuda a la identificación del endotelio. Como se aprecia en la Tabla 1, el bFGF es un factor angiogénico por lo que su efecto sobre el cultivo obtenido puede ser indicador de su origen endotelial. El efecto de concentraciones crecientes del bFGF sobre la proliferación de las células de capilares de la retina de la rata se muestra en la Figura 8. Se detecta un claro efecto dosis-respuesta al bFGF a las 24 horas del cultivo de acuerdo con la incorporación de $^3\text{H-T}$, el cual resulta ser significativo con respecto al control.

6.- Proliferación estimulada por el VEGF

El efecto mitogénico del VEGF se presenta únicamente en las células endoteliales, por lo que su efecto sobre el cultivo obtenido es un indicador confiable de su carácter endotelial.

Los resultados presentados en este trabajo muestran que el VEGF estimula de manera dosis dependiente la proliferación de las células de capilares de la retina a las 60 horas del cultivo como puede apreciarse en la Figura 9. Las diferencias detectadas con el VEGF sobre la proliferación son estadísticamente significativas.

En la Tabla 2 se muestra un resumen de los resultados de la caracterización de las células de la retina como endotelio:

Tabla 2.- Caracterización del cultivo como endotelio

CRITERIO	RESULTADO
Formación de monocapas	Positivo
Inhibición de la proliferación por contacto	Positivo
Inmunocitoquímica de la proteína v.W.	Positivo
Unión de la lectina UEA-I	Positivo
Unión de la lectina BS-I	Positivo
Formación de capilares en geles de colágena	Positivo
Proliferación estimulada por el bFGF	Positivo
Proliferación estimulada por el VEGF	Positivo

Una vez caracterizado el cultivo como endotelio, de acuerdo con los parámetros descritos anteriormente, se procedió a la determinación de la expresión de la PRL como se describe a continuación:

III.- Determinación de la expresión de PRL

1.- Inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-rPRL 23 K

Con el propósito de extender las observaciones realizadas en las células BBE y HUVE en el sentido de que estas células expresan PRL, se realizó una inmunocitoquímica en contra de la rPRL. Para ello, las células de la retina o las células testigo se crecieron sobre cubreobjetos cubiertos con fibronectina y se sometieron a una inmunotinción en contra de la rPRL 23 K utilizando el anticuerpo policlonal S9 a una dilución de 1:1000. Como se observa en la Figura 10B las células de capilares de la retina resultaron inmunopositivas a la PRL en el citoplasma. En este caso la línea de lactotopos de rata GH₄ fue utilizada como control positivo de la inmunotinción, como se aprecia en la Figura 10A. La Figura 10C muestra el control sin primer anticuerpo y la Figura 10D el control con suero preinmune 1:1000. En ambas figuras no se aprecia tinción.

2.- Análisis Southern blot de la expresión de PRL

Con el objeto de determinar si las células de la retina de rata expresan el gen de la PRL se realizó un análisis de Southern blot.

El ARN extraído de las células de los capilares de la retina se retrotranscribió para su posterior amplificación mediante PCR con la combinación de dos oligonucleótidos que comprenden la región 5'-3' del exón 2 y la región 3'-5' del exón 4 del gen de la PRL de la rata. El producto de amplificación con estos dos oligonucleótidos presenta un peso molecular de 388 pares de bases. En la Figura 11, se puede observar el análisis mediante Southern Blot de los productos de amplificación con la utilización de la sonda de rPRL. En la línea 1 se observa la clona sp65 positiva, la cual contiene el gen de la rPRL y que por lo tanto es utilizada como control positivo. La línea 2 corresponde a un control sin cDNA en el cual no se observa hibridación. Las líneas 3, 4, 5 y 6 corresponden a la hibridación del cDNA amplificado de las GH₄, de las células de la retina, de la línea GnRHérgica GT1 y de los

fibroblastos de piel de rata, respectivamente. En todos los casos anteriores la hibridación resultó positiva.

3.- Efecto del anticuerpo anti-rPRL 23K de rata sobre la proliferación

Con el objeto de determinar si la PRL presente en estas células interviene en la proliferación de las mismas, se planteó este experimento tratando de bloquear su supuesto efecto mediante la utilización del anticuerpo policlonal S9 anti-rPRL 23 K, utilizado a distintas diluciones: 1:1000, 1:2500 y 1:12500, solo o en presencia de 2 ng/ml de bFGF. En la Figura 12A, se puede apreciar que a las 48 horas de cultivo las diluciones de 1:1000 y 1:2500 inhiben significativamente la proliferación estimulada por el bFGF, mientras que la dilución de 1:12500 no muestra ningún efecto.

Se verificó que el efecto del anticuerpo policlonal fuera específico al incubarlo con PRL 23 K 100 nM. Este efecto se observa en la Figura 12B, donde se puede apreciar que la combinación anticuerpo- rPRL 23 K 24 horas antes de añadirla al cultivo, bloquea de manera significativa el efecto inhibitorio del anticuerpo tanto sobre la proliferación basal como en la estimulada por el bFGF.

No se descarta la posibilidad de que el exceso de rPRL 23 K no unida al anticuerpo sea la responsable del incremento de la proliferación de las células de capilares de la retina, por lo que el efecto de la rPRL 23 K sola se exploró a continuación:

4.- Efecto de la PRL 23 K sobre la proliferación

Con base en los resultados descritos anteriormente, se exploró la posibilidad de que las células de la retina produzcan la rPRL como un factor autocrino de proliferación, por lo que se planteó un experimento de proliferación en respuesta a rPRL 23 K 100 nM. En los resultados obtenidos (Figura 13) se observa que al añadir rPRL en el cultivo celular se incrementa significativamente su proliferación basal. Sin embargo, este efecto estimulador no es sumatorio al efecto estimulador del bFGF.



Figura 1.- Formación de colonias con apariencia endotelial por las células de la retina de la rata a los 8 días del cultivo.

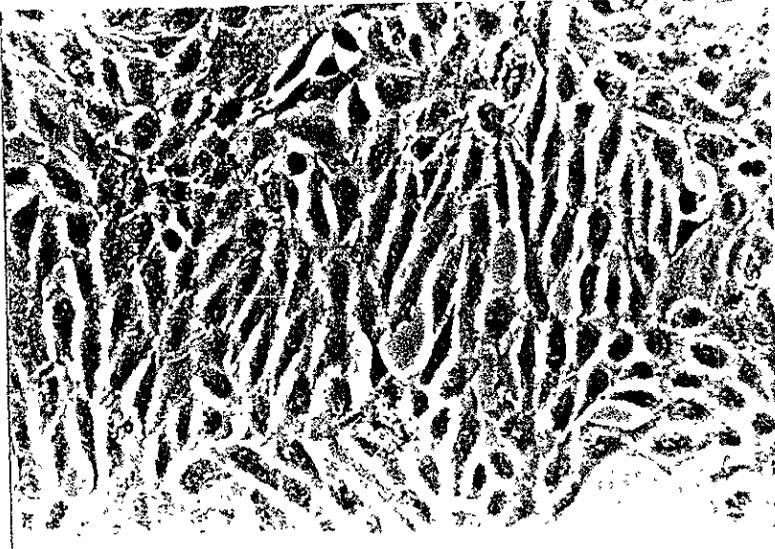


Figura 2.- Formación de monocapas por las células de la retina clonadas.

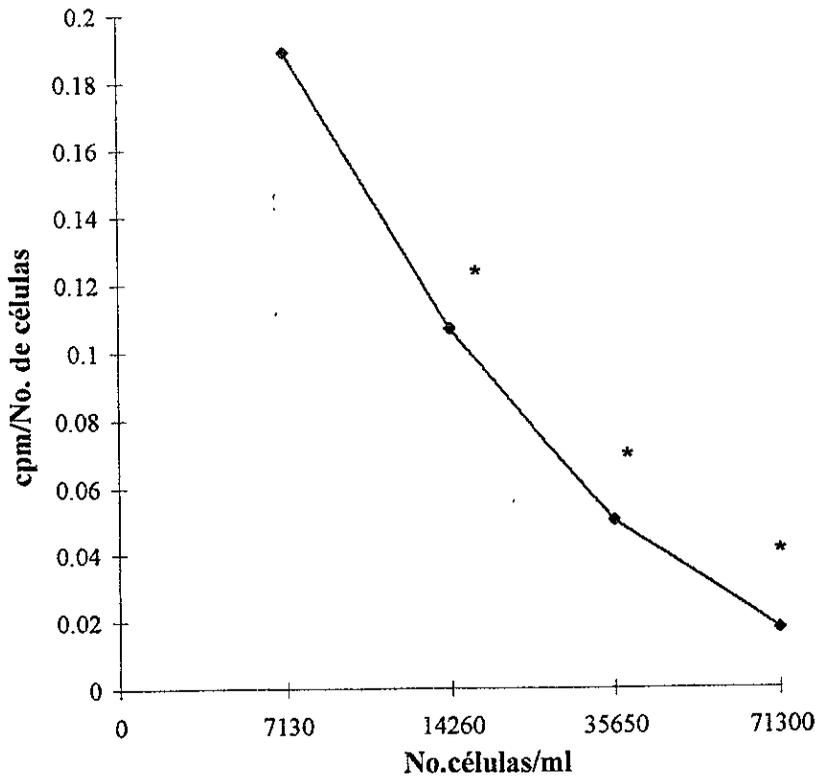


Figura 3.- Inhibición de la proliferación por contacto de las células de la retina.
* $p < 0.05$ con respecto a la concentración inicial de células.

A)



B)



C)



Figura 4.- Inmunocitoquímica en contra de la proteína vW humana. La dilución del anticuerpo fue de 1:500. A) HUVEC utilizadas como control positivo. B) Células de la retina de la rata. C) Control sin primer anticuerpo de las células de la retina.

A)



B)

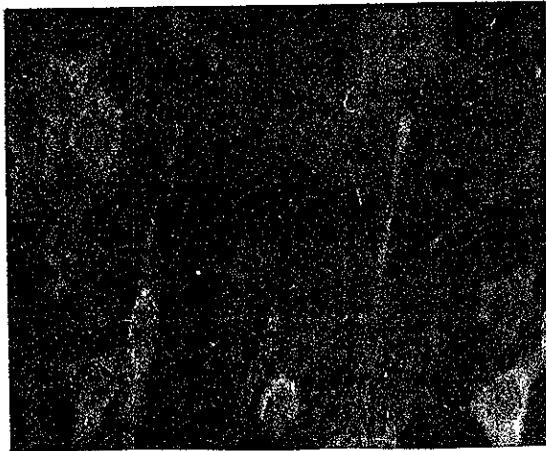
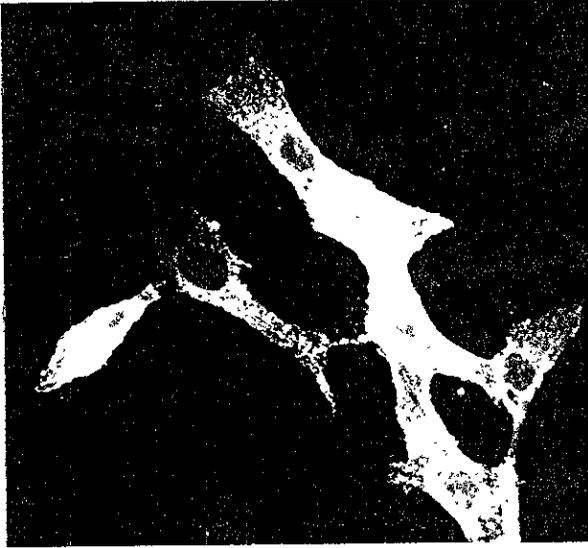


Figura 5.- Unión a la lectina UEA-I por células de la retina (A), y por los fibroblastos 3T3 (B).

A)



B)

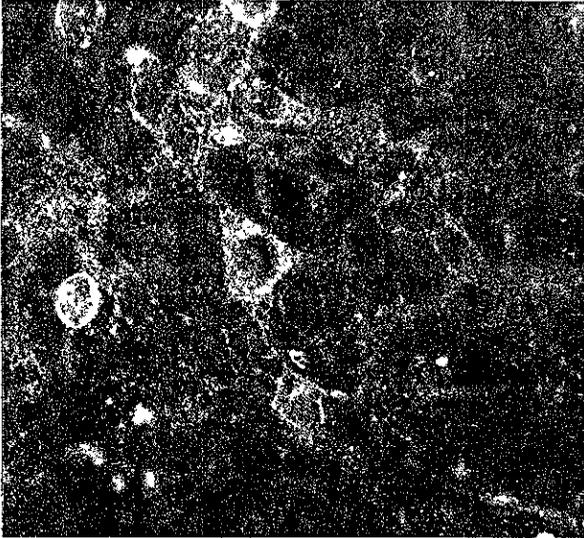


Figura 6.- Unión a la lectina BS-I por células de la retina (A), y por los fibroblastos 3T3 (B).

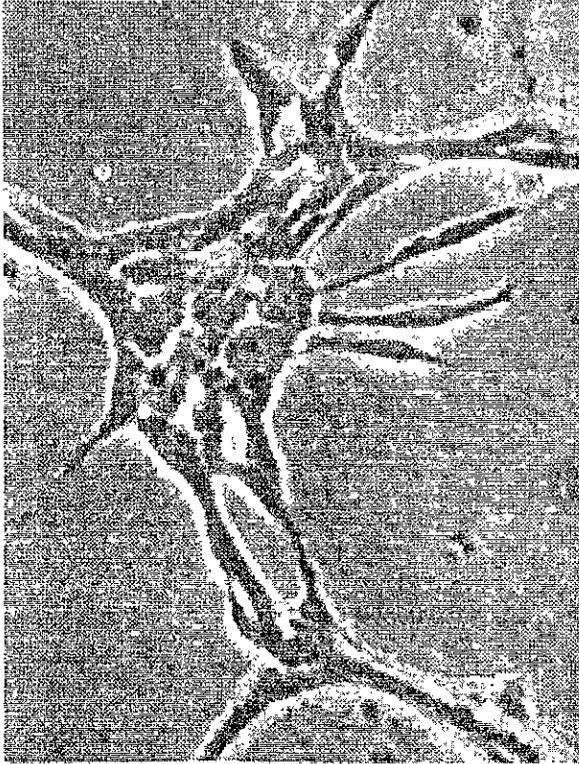


Figura 7.- Organización de estructuras tipo-capilar entre dos geles de colágena tipo I por las células de la retina cultivadas con 2 ng/ml del bFGF. Estas estructuras se observaron 72 horas después de que las células fueron sembradas.

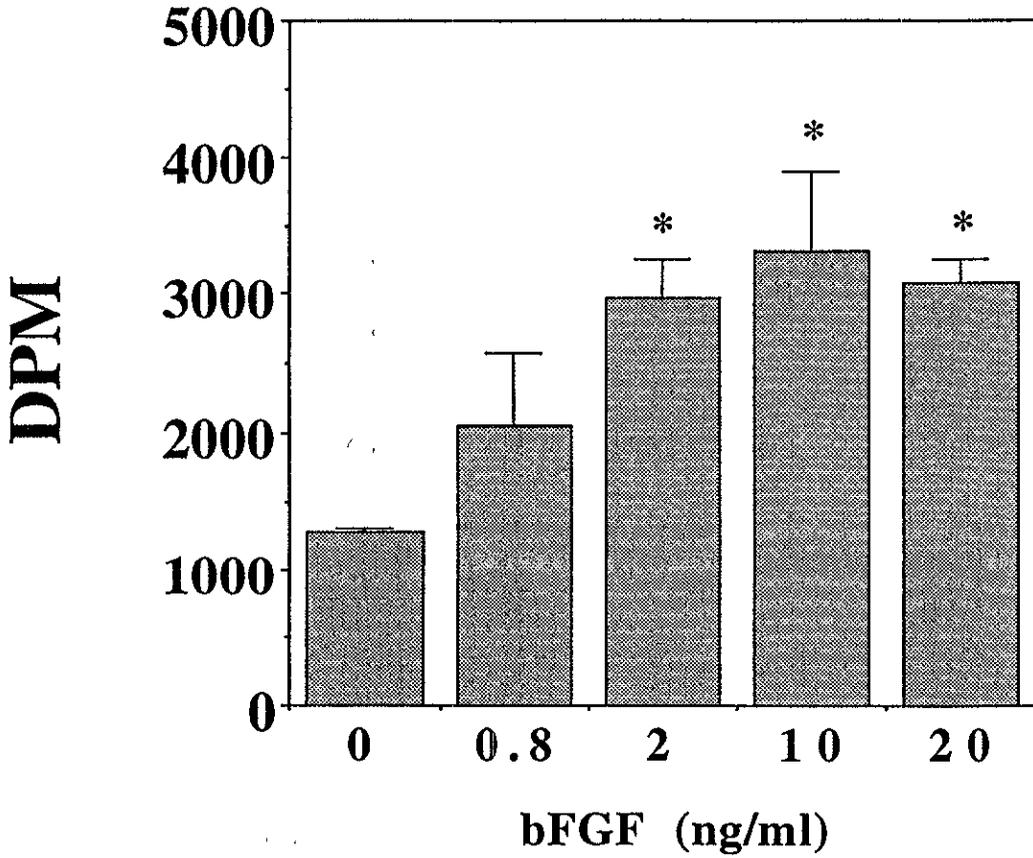


Figura 8.- Proliferación estimulada por el bFGF en las células de la retina de manera dosis-respuesta. * $p < 0.05$ con respecto al control.

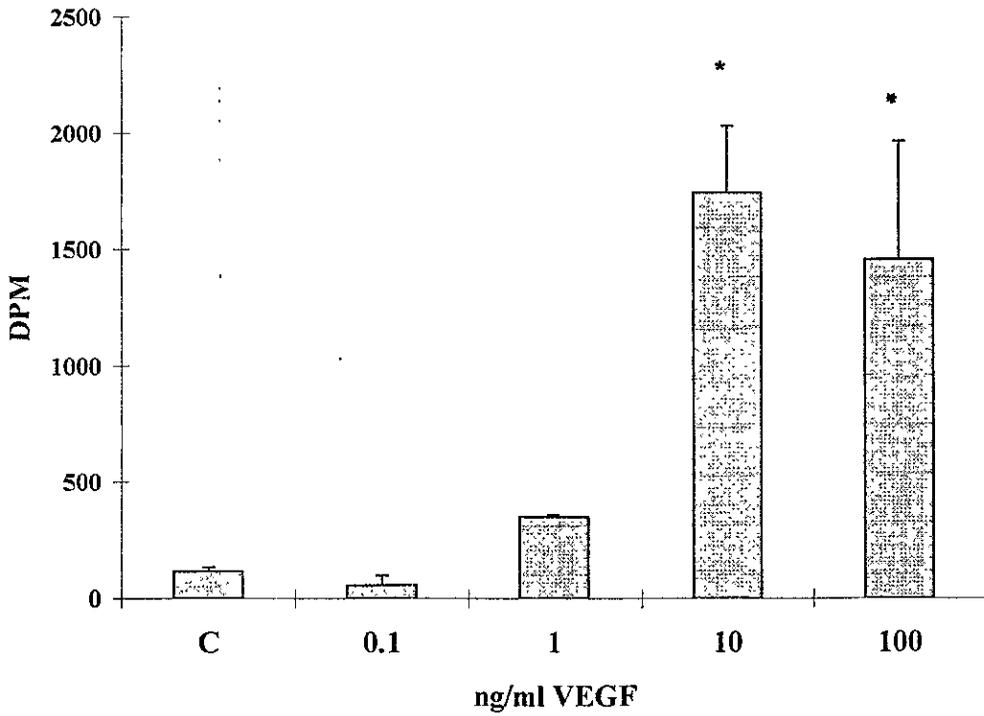


Figura 9.- Proliferación estimulada por el VEGF en las células de la retina de manera dosis-respuesta. * $p < 0.05$ con respecto al control.

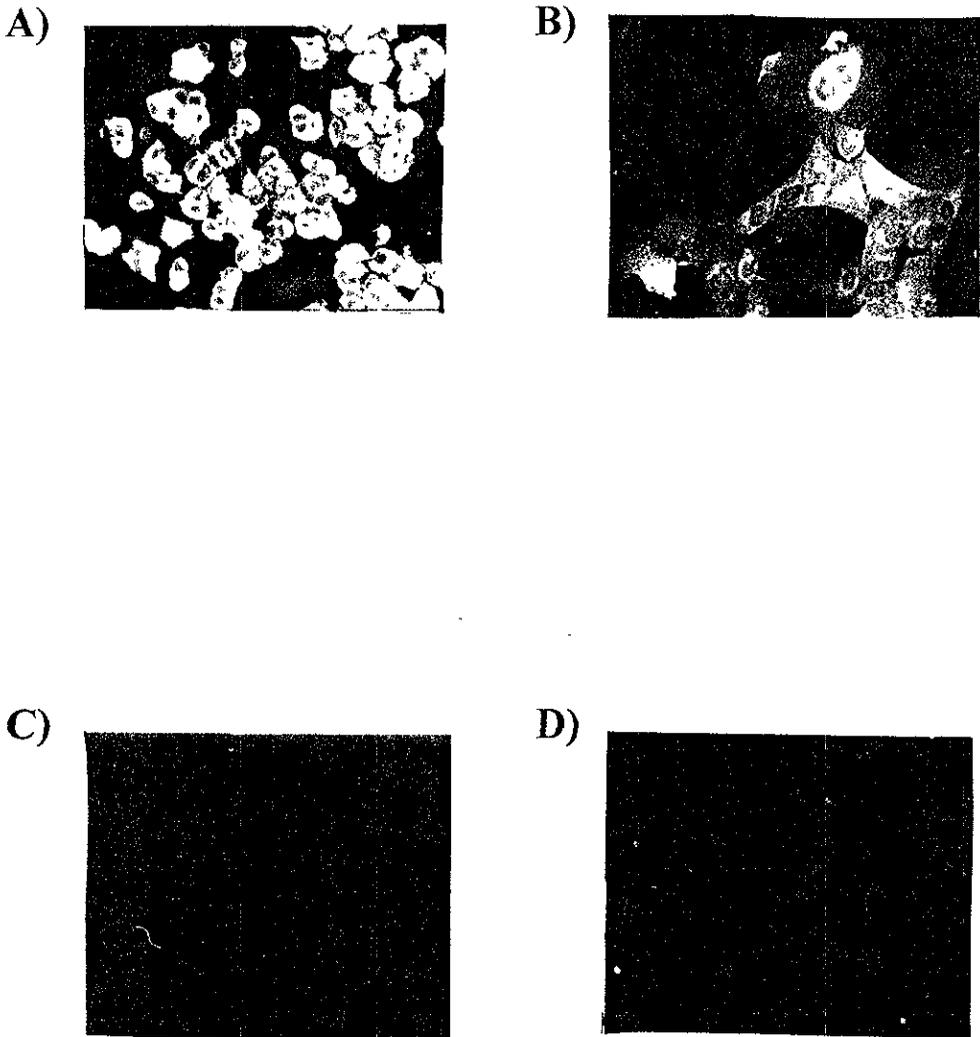


Figura 10.- Inmunocitoquímica en contra de la rPRL 23 K utilizando el anticuerpo policlonal S9 a una dilución de 1:1000. En A) se muestra el control positivo, las células GH4; en B) se encuentran las células de la retina; en C) el control sin primer anticuerpo de las células de la retina y en D) el control con suero preimmune diluido 1:1000 de las células de la retina.

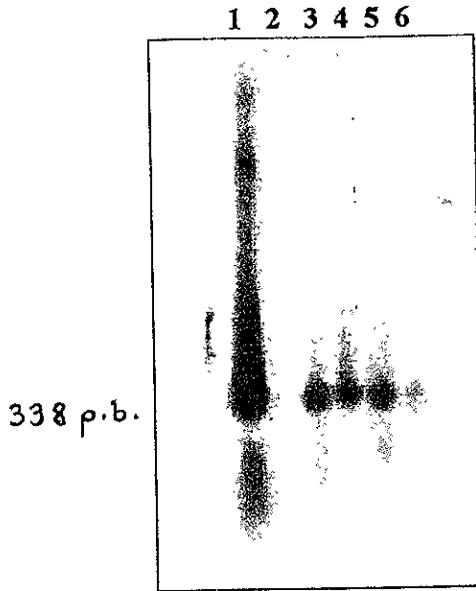


Figura 11.- Análisis de Southern Blot de productos RT-PCR amplificados e hibridados con rPRL. El producto de amplificación presenta un tamaño de 388 pares de bases. En la línea 1 se observa la clona sp65, en la línea 2 un control sin cDNA, en la línea 3 células GH₄, en la línea 4 las células de la retina, en la línea 5 células GT1, y en la línea 6 fibroblastos de piel de rata.

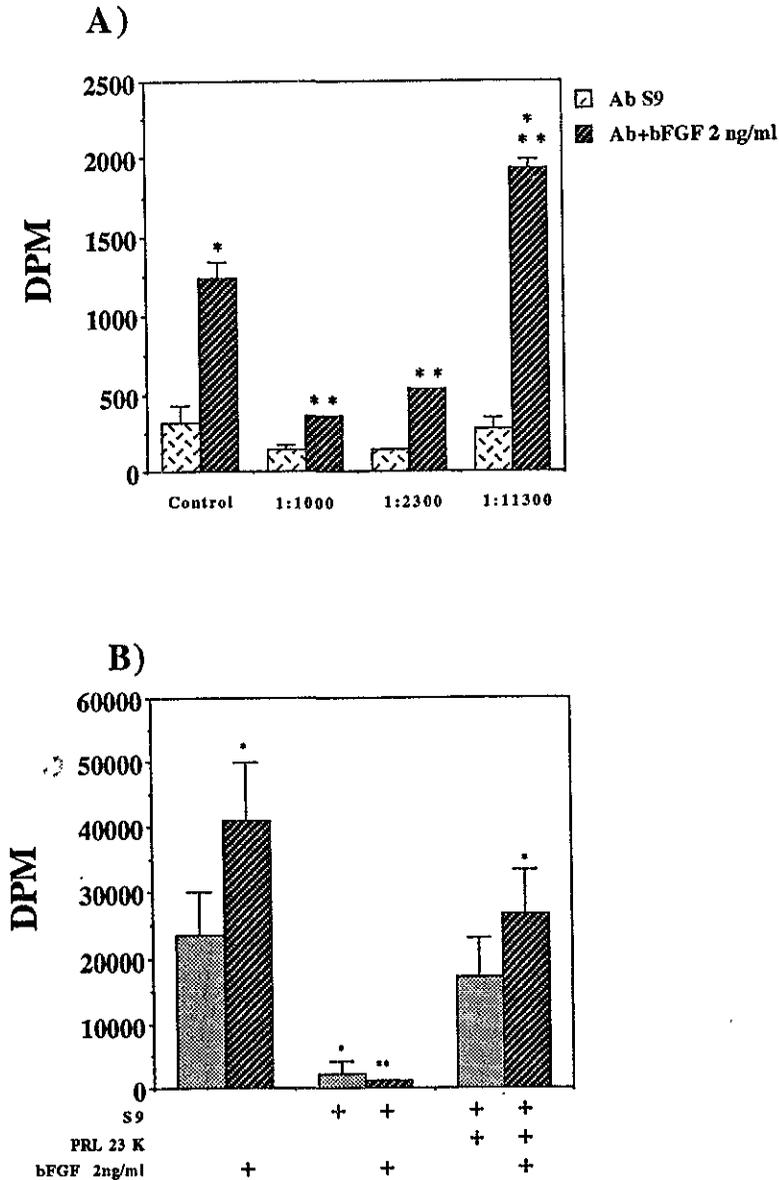


Figura 12.- A) Bloqueo de la proliferación estimulada por 2 ng/ml del bFGF en las células de la retina de la rata, utilizando el anticuerpo policlonal S9 a distintas diluciones en presencia y ausencia del bFGF. B) Coincubación del S9 (1:2500) con rPRL 23 K a una dosis de 100 nM. * $p < 0.05$ con respecto al control. ** $p < 0.05$ con respecto al bFGF.

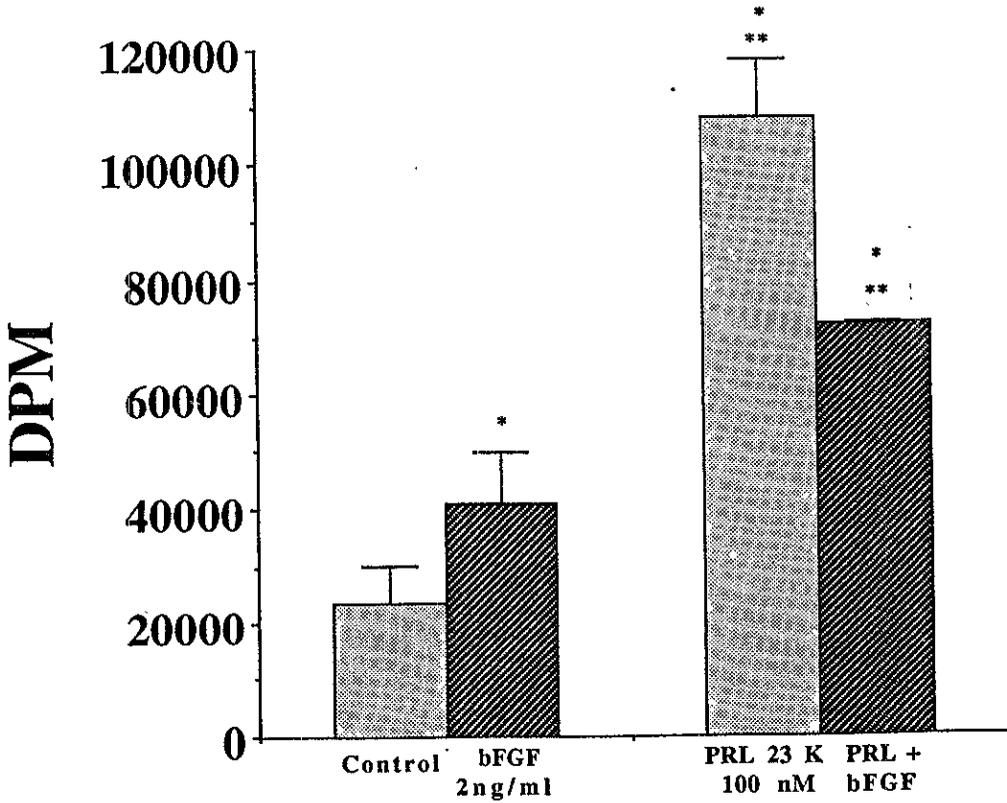


Figura 13.- Efecto de la rPRL 23 K 100 nM sobre el cultivo de la retina de la rata, tanto sola como en conjunto con 2 ng/ml del bFGF. * $p < 0.05$ con respecto al control. ** $p < 0.05$ con respecto al bFGF.

DISCUSIÓN

Caracterización y validación del cultivo endotelial

En el presente estudio se logró obtener un cultivo endotelial de retina de rata, el cual fue validado de acuerdo a diversos parámetros histológicos, bioquímicos y funcionales reportados en otros trabajos. Dentro de estos se utilizaron criterios morfológicos, de inmunotinción, de unión a lectinas, así como la respuesta de estas células a diversos factores mitogénicos.

Con relación a los parámetros morfológicos, se consideró la formación de monocapas, la inhibición de la proliferación por contacto y la organización tridimensional de las células en estructuras tipo-capilar cuando son cultivadas entre dos geles de colágena. De acuerdo con estos criterios los resultados de este trabajo muestran que las células de la retina clonadas forman monocapas, semejando la morfología descrita en otros cultivos (Greenwood, J., 1992). De igual forma, se observó inhibición de la proliferación de los cultivos al alcanzar confluencia. La inhibición de la proliferación por contacto se ha considerado como una característica del endotelio, como lo describen Dejana, E. y cols., (1995), e Ingber, D., (1991). Finalmente cuando estas células fueron sembradas entre dos geles de colágena, formaron estructuras de tipo tubular, lo que se considera como un proceso reminiscente de la angiogénesis. La formación de estructuras tipo capilar por células endoteliales en matrices de colágena ha sido estudiada para simular las condiciones del endotelio *in vivo* (Montesano, R. y cols., 1983). Es por ello que a esta propiedad se le puede considerar como un parámetro identificador de endotelio, ya que hasta el momento no se ha reportado que otros tipos celulares se organicen de tal manera. Por todas estas evidencias se sugiere inicialmente que las células obtenidas de la retina corresponden a células diferenciadas como endotelio. Sin embargo, en diversos métodos de cultivo de células endoteliales de la retina se han descrito contaminaciones con tipos celulares como los pericitos o las células del epitelio pigmentoso (Su, T. y Gilles, M. C., 1992). La contaminación de las células del epitelio pigmentoso se eliminó al remover continuamente las células no adheridas. La contaminación con pericitos suele resolverse al sembrar la retina sobre una matriz de fibronectina, añadiéndole DMEM suplementado con heparina (Su, T. y Gilles, M. C., 1992; y Capentandes, A. y Gerritsen, M.E., 1990). Por otra parte los fibroblastos también pueden ser una fuente de contaminación, aunque el hecho de que los cultivos obtenidos crezcan formando monocapas, indica que estos constituyen la mayor parte del cultivo,

ya que no forman estos "empedrados" y no inhiben su proliferación por contacto.

Con relación a los criterios de inmunotinción, estos se utilizan para determinar la presencia de antígenos específicos que son producidos únicamente por las células endoteliales. En este trabajo se determinó la presencia del factor von Willebrand, el cual es un reconocido marcador de endotelio (Powell, J.T. y cols., 1992) ya que solo es producido en células endoteliales y megacariocitos y actúa como un ligando plaquetario en los procesos de adhesión plaquetas-endotelio (Roth, G.J., 1992). La inmunotinción de las células del cultivo de retina fue positiva al factor vW, lo que constituye un indicador más de que el cultivo obtenido es efectivamente de naturaleza endotelial. Las diferencias detectadas en la inmunotinción con respecto a las HUVEC que fueron marcadas en forma más intensa, pueden deberse a que el anticuerpo utilizado está generado en contra de la proteína vW humana, por lo que la inmunotinción homóloga puede ser más eficaz que la heteróloga, o bien se puede deber a la heterogeneidad funcional que presenta el endotelio dependiendo del tipo de vasculatura de la que proviene (Gerritsen, M.E., 1987).

Otro criterio utilizado en la caracterización del endotelio, fue la unión de diversas lectinas a residuos de azúcares específicos localizados en la membrana de las células endoteliales. Al respecto, en este trabajo se utilizaron dos lectinas: la UEA-I y la BS-I. La lectina primera se une a los residuos de α -fucosa localizados en la membrana de todos los tipos de endotelio estudiados, mientras que en otros tipos celulares, como son los fibroblastos, no hay unión (Hölthfer, H. y cols., 1982). Consistentes con este dato, los resultados obtenidos en este trabajo muestran marcaje en los cultivo de la retina, mientras que en fibroblastos 3T3 la tinción detectada fue débil.

La utilización de la lectina BS-I para caracterizar endotelio también se ha reportado (Magee, J. C. y cols., 1994). Esta es una lectina que se une a los residuos de α -D-galactopiranososa localizados preferencialmente en las membranas de las células endoteliales provenientes de la microvasculatura, mientras que en el endotelio de vasos grandes o en otros tipos celulares, la unión es débil o prácticamente no la hay (Laitinen, L., 1987). La tinción que se observa con esta lectina en nuestros cultivos, así como la carencia de marcaje de fibroblastos, sugieren que las células endoteliales en cultivo provienen de capilares, como era de esperarse por el origen retiniano de las mismas.

La respuesta de las células endoteliales a diversos factores mitogénicos, ha sido ampliamente estudiada, como se aprecia en la Tabla 1 de la

introducción. Muchos de estos mitógenos son factores de crecimiento con amplios espectros de acción. Entre estos, se encuentra el bFGF, el cual, si bien es un factor mitogénico para una gran variedad de tipos celulares (Gospodarowicz, D., 1990), está muy bien reconocida y estudiada su acción angiogénica (Folkman, J. y Shing, Y., 1992) e incluso se ha reportado su expresión en la retina (Bensaid, M. y cols., 1989).

Así como al bFGF se le ha reportado como un factor de crecimiento de muchos tipos celulares existen otros mitógenos que son específicos. El mejor ejemplo de lo anterior es el VEGF, al cual se le ha considerado como un mitógeno exclusivo de células endoteliales provenientes tanto de vasos grandes como de capilares (Jakeman, L.B. y cols., 1992). Asimismo, la angiogénesis patológica de la retina en respuesta al VEGF se ha estudiado ampliamente, ya que este factor se expresa en este tejido después de la exposición a un medio ambiente hipóxico (Pe'er, J., y cols., 1995, y Simorre-Pinatel, V., y cols., 1994.). La expresión del VEGF durante el desarrollo de los capilares de la retina (vasculogénesis) de la rata también se ha reportado (Murata, T., y cols., 1996, Ferrara, N., 1995). Considerando los datos anteriores, la proliferación observada en este trabajo de los cultivos de retina de rata en respuesta al VEGF debe ser interpretada como un fuerte indicador de que el cultivo obtenido es de naturaleza endotelial.

El método utilizado en este trabajo para obtener células endoteliales de retina de rata representa ciertas ventajas en comparación con el método que se describe en un trabajo previo por Greenwood, J. (1992). En este estudio, se obtiene el cultivo de las células endoteliales mediante un procedimiento largo basado en la obtención de capilares de cerebro, por lo que se requiere de muchas centrifugaciones y de incubaciones enzimáticas para tener la red capilar, lo que a su vez representa muchas veces que las células se dañen. En comparación el método que aquí se reporta no requiere de tantos pasos de extracción del endotelio por lo que resulta más sencillo y rápido. Por otra parte, el hecho de que la retina permanezca durante 72 horas en el cultivo hace que las células endoteliales se encuentren en un ambiente propicio con los factores tróficos que normalmente actúan sobre ellas. Además no se dañan o mueren durante el proceso de extracción. Sin embargo, ambos trabajos coinciden en el hecho de que las células endoteliales de la retina de rata producen al factor vW, lo que respalda los resultados obtenidos en este estudio.

Determinación de la expresión de PRL por el cultivo de endotelio de retina de rata

En vista de que fue concluida la caracterización del cultivo de retina de rata como endotelio, se prosiguió con el propósito de determinar si en este cultivo se expresa el gen de la PRL. Con este fin se utilizaron estrategias inmunológicas, para detectar a la proteína, y estrategias moleculares para detectar la expresión del ARNm de la PRL. Ambas son complementarias.

Con relación a las estrategias inmunológicas, mediante inmunocitoquímica se observó la presencia de un antígeno tipo PRL en estos cultivos. Esta tinción parece ser específica, ya que en los controles utilizados no se observó. Por otra parte y dado que cabía la posibilidad de que el cultivo presentara contaminación por fibroblastos, en este mismo experimento se utilizó la línea de fibroblastos 3T3, la cual a la dilución utilizada del anticuerpo, no se tiñó. Las condiciones de la inmunocitoquímica fueron estrictas, y de esta manera se aseguró el bloqueo de sitios inespecíficos tanto con el suero normal de cabra, como con la albúmina en el amortiguador, esto aunado con el tiempo de incubación del suero, el cual fue mayor que lo reportado normalmente (16 horas vs. 2 horas). El tiempo de incubación con el anticuerpo S9 fue de menor duración que lo habitual (4 horas vs. 16 horas). Pese a estas limitantes condiciones de inmunotinción el cultivo de la retina resultó positivo a un título relativamente bajo del anticuerpo (1:1000), esto sugiere que las células endoteliales de la retina de la rata contienen un antígeno tipo PRL.

Con relación a las estrategias moleculares, se realizaron experimentos de retrotranscripción-PCR y de análisis de tipo Southern. Los resultados al respecto son consistentes con la afirmación de que las células de la retina expresan el gen de la PRL. Un producto de amplificación con el tamaño esperado hibridizó con la sonda de la rPRL. Este dato coincidió con los productos detectados en los controles positivos utilizados, los cuales fueron la línea de lactotropos de rata GH4 que produce una gran cantidad de PRL y el plásmido que contiene insertado el gen de la PRL (clona sp65). De igual forma se detectó la expresión de la PRL en células GT1 y en fibroblastos de piel de rata. Por lo que respecta a la detección de la PRL en los fibroblastos, ésta refuerza hallazgos previos en los que se ha observado la expresión de la misma en fibroblastos de la decidua uterina (Richards, R.G. y cols., 1995) y la expresión de proteínas relacionadas con la PRL como la proteína regulada por mitógeno (MRP) y la PLF en la línea de fibroblastos 3T3 (Nielsen-Hamilton, M., y cols., 1987 y 1991), de tal forma que el encontrar la expresión de la PRL

en estas células no fue sorprendente. La posibilidad de contaminación con cDNA de rPRL se descartó, ya que en el control sin cDNA no se observa amplificación o hibridación. De igual forma la extracción y la retrotranscripción del ARN de todos los tipos celulares se realizó por duplicado así como el análisis de Southern, de tal manera que la posibilidad de que las muestras presentaran algún tipo de contaminación fue menor.

Finalmente, con el objeto de explorar si la PRL es producida como un factor autocrino por las células de la retina, estas fueron cultivadas con un anticuerpo anti-rPRL 23 K, para determinar si se modificaba la proliferación basal o la estimulada por el bFGF. Los resultados al respecto muestran que la adición de un anticuerpo anti-rPRL 23 K inhibe la proliferación de las células endoteliales de la retina de rata estimulada por el bFGF. Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante el análisis de Southern, ya que el ARN se extrajo de células que proliferaban en presencia del bFGF. Estos hallazgos permiten especular que este factor de crecimiento induce la expresión de una proteína tipo PRL y que presumiblemente ésta participa en la regulación de la proliferación de estas células ya que se inactiva con la adición del anticuerpo.

Con el propósito de determinar si el bloqueo de la proliferación de las células endoteliales de la rata se debía a un efecto específico del anticuerpo y no a un efecto tóxico del mismo, éste se incubó previo al experimento con PRL 23 K a una dosis de 100 nM. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la combinación anticuerpo-PRL bloquea el efecto inhibitorio del anticuerpo, por lo que es muy probable que el efecto detectado del S9 sea específico. Apoyando este resultado y bajo la suposición de que el efecto inhibitorio del anticuerpo podía deberse a endotoxinas presentes en el mismo, se encuentran datos del laboratorio en los que no se detectan endotoxinas en anticuerpos utilizados en ensayos de proliferación de las HUVEC.

Asimismo, se exploró la posibilidad de que el bloqueo del efecto inhibitorio del S9 podía deberse a un exceso de PRL no unida al mismo, ya que la dosis utilizada fue alta (100 nM). Sorprendentemente los resultados de este trabajo muestran que la rPRL 23 K a una dosis de 100 nM estimula la proliferación de las células de la retina. La posibilidad de que este efecto se deba a prolactinas presentes en el medio de cultivo está descartada, ya que este experimento se desarrolló cultivando a las células en medio con baja concentración de suero fetal bovino (0.1%). Este dato contrasta con los resultados obtenidos en HUVEC y en BBEC, en los que esta hormona nativa no tiene efecto. Este hecho puede explicarse, al menos en parte, con base en que las células endoteliales difieren en la función que desempeñan dependiendo

del tejido en el que se encuentran (Gerritsen, M.E., 1987), por lo que el posible efecto que ejerce la PRL en la regulación de la proliferación del endotelio puede variar de acuerdo con el tipo de vasculatura a la que pertenece. Estas diferencias pueden ser aún mayores si se trata de células endoteliales que conforman capilares en comparación con aquellas que conforman venas o arterias. De igual forma existe la posibilidad de que estas diferencias sean especie específicas. Finalmente el hecho de que el cultivo obtenido de la retina de la rata prolifere en respuesta a la PRL 23 K, fortalece la hipótesis de que este endotelio produce esta hormona u otras variantes como un factor autocrino.

El hecho de que proteínas pertenecientes a la familia de la PRL produzcan efectos antagónicos sobre el endotelio no es sorprendente. En la Tabla 1 se observa que el TGF- β ó PLF y PRP presentan un comportamiento opuesto sobre la angiogénesis semejante al que se observa con las prolactinas: la PRL 16 K (con un efecto antiangiogénico) y la rPRL 23 K (con un efecto estimulador de la proliferación del endotelio de retina de rata) como se muestra en este trabajo. Es necesario realizar curvas dosis-respuesta de proliferación con la PRL 23 K para verificar que este efecto no se debe a la alta concentración de la hormona utilizada para los ensayos.

En el Diagrama 3 se muestra una representación de algunos de los eventos de transducción de señales que pueden estar ocurriendo en las células endoteliales. Este diagrama presenta algunos de los resultados obtenidos en este trabajo junto con otras evidencias ya reportadas. De manera general lo que se puede estar presentando en la célula endotelial es que al unirse el bFGF a su receptor se activa una vía de señalización que puede resultar en la expresión del gen de una PRL endotelial. Esta PRL puede estar regulando autocrinamente la proliferación de las células endoteliales, por lo que al unirse a su receptor (no reportado hasta el momento) activa parte de la vía con la que también está involucrado el bFGF. Se ha reportado la activación de ras por el PRLR, pero no se sabe si es a través de la cinasa de Janus 2 (JAK2) o a través de otra cinasa. En este mismo diagrama se muestra el efecto ya reportado que ejerce la PRL 16 K al inactivar a la MAPK, pero se desconocen las proteínas involucradas con este evento.

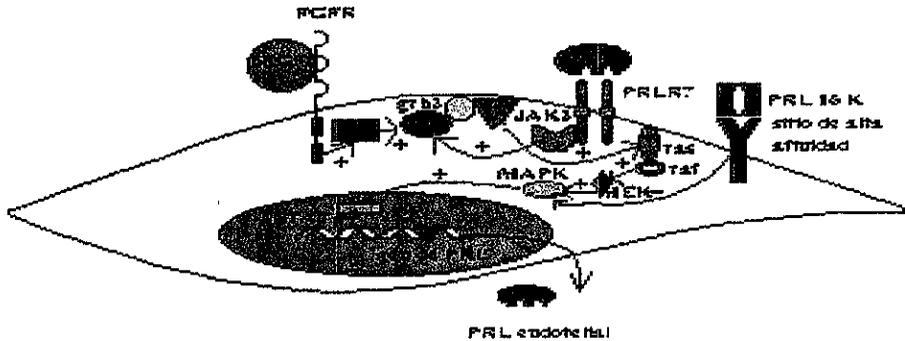


Diagrama 3.- Representación de eventos de transducción de señales que son desencadenados por PRL de células endoteliales

En síntesis, este trabajo presenta un nuevo método de obtención de células endoteliales de retina de rata y por consiguiente brinda la posibilidad de estudiar la regulación de la angiogénesis en estas células. Los resultados mostrados sugieren que la PRL es un factor autocrino regulador de la angiogénesis y permiten esclarecer muchos aspectos de la función que ejerce en el endotelio de la retina, como lo es la vía de transducción mediante la cual actúa, el receptor al que se une o las condiciones mediante las cuales se expresa.

CONCLUSIONES

* De acuerdo con los parámetros de caracterización utilizados, el cultivo obtenido de la retina de la rata es endotelio.

* Las células endoteliales de la retina de la rata, expresan el ARNm de la PRL así como un antígeno tipo-PRL.

* La PRL producida por las células endoteliales de retina de rata participa en su proliferación..

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1994). *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., New York & London.
- Auerbach, W. y Auerbach, R. (1994). Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmac. Ther.*: 63, 265-311.
- Augustin, H.G., Kozian, D.H. y Johnson, R.C. (1994). Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*: 16 (12), 901-906.
- Bensaid, M., Malecaze, F., Prats, H., Bayard, F. y Tauber, J.P. (1989). Autocrine regulation of bovine retinal capillary endothelial cell (BREC) by BREC derived basic fibroblast growth factor. *Exp. Eye Res.*: 48, 801-813.
- Capentades, A. y Gerritsen M.E. (1990). Simplified methods for consistent and selective culture of bovine retinal endothelial cells and pericytes. *Inv. Ophthalm. Vis. Sci.*: 31 (9), 1738-1744.
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of ARN isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*: 162, 156-159.
- Clapp, C. y Martínez de la Escalera, G. (1997). Prolactins: novel regulators of angiogenesis. *News Physiol. Sci.*: 12, 236-242.
- Clapp, C. y Weiner, R.I. (1992). A specific, high affinity, saturable binding site for the 16 kilodalton fragment on capillary endothelial cells. *Endocrinology*: 130 (3), 1380-1386.
- Clapp, C., Martial, J., Guzman, R., Rentier-Delrue, F. y Weiner, R. (1993). The 16-kilodalton n-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*: 133 (3), 1292-1299.
- Cozzolino, F., Torcia, M., Lucibello, M., Morbidelli, L., Ziche, M., Platt, J., Fabiani, S., Brett, J. y Stern, D. (1993). Interferon α and IL-2 synergistically enhance bFGF synthesis and induce release, promoting endothelial cell growth. *J. Clinical Inv.*: 91, 2504-2512.

D'Angelo, G., Struman, Y., Martial, J., y Weiner, R.I. (1995). Activation of mitogen activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16 kDa N-terminal fragment of prolactin. *PNAS, USA*: 92, 6374-6378.

Dejana, E., Corada, M. y Lampugnani, M.G. (1995). Endothelial cell to cell junction. *FASEB*: 9, 910-918.

Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M. y Dvorak, A.M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular permeability and angiogenesis. *Am. J. Pathol.*: 146, 1029-1039.

Emanuele, N., Juergens, J., Halloran, M., Tentler, J., Lawrence, A. y Kelley, M. (1992). The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternative spliced prolactin messenger RNA. *Molecular endocrinology*: 6 (1), 35-42.

Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem*: 132, 6-13.

Ferrara, N. (1995). Vascular endothelial growth factor. The trigger for neovascularization in the eye. *Lab. Investigation*: 72: 615-618.

Ferrara, N. Clapp, C. y Weiner, R. (1991). The 16 K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*: 129 (2), 896-900.

Ferrara, N., Houck, K.A., Jakeman, L.B., Winer, J., y Leung, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J. Cell. Biochem.*: 47, 211-218.

Fields, K., Kuling, E. y Lloyd, R. (1993). Detection of prolactin messenger RNA in mammary and other normal and neoplastic tissues by polimerase chain reaction. *Laboratory investigation*: 68 (3), 354-360.

Folkman, J. y Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science*: 25, 442-447.

- Folkman, J. y Shing, Y. (1992). Angiogenesis. Minireview. *Journal of biological chem.*: 267 (16), 10931-10934.
- Friesel, R.E. y Maciag, T. (1995). Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *The FASEB Journal*: 9, 919-925.
- Gerritsen, M.E. (1987). Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol*, 36: 2701-2711.
- Good, D.J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M, Lemons, R.S., Frazier, W.A., y Bouck, N.P. (1990). A tumor supressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *PNAS, USA* :87, 6624-6628.
- Gospodarowicz, D. (1990). Fibroblast growth factor and its involvement in developmental process. En: "growth factors and development". Nilsen-Hamilton, M. De. Academic Press, Inc. Current Topics in Developmental Biology: 24.
- Greenwood, J. (1992). Characterization of a rat retinal endothelial cell culture and the expression of P-glycoprotein in brain and retinal endothelium in vitro. *Journal of Neuroimmunology*: 39, 123-132.
- Gubbins, E., Maurer, R., Lagrimini, M., Erwing, C. y Donelson, J. (1980). Structure of the rat prolactin gene. *The Journal of Biological Chemistry*: 255 (18), 8655-8662.
- Guyton, A. (1991). Tratado de Fisiología Médica. Octava de., De. Interamericana-McGraw Hill.
- Hanahan, D. y Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*: 86, 353-364.
- Höhlhofer, H., Virtanen, Y., Kariniemi, L., Hormia, M., Linder, E., y Miettinen, A. (1982). *Ulex europaeus* I Lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab. Inv.*: 47 (1), 60-66.
- Hughes, C.C.W., Savage, C.O.S. y Pober, J.S. (1990). The endothelial cell as a regulator of T-cell function. *Immunological reviews*: 117, 85-102.

Ingber, D., (1991). Extracellular matrix and cell shape: potential control points for inhibition of angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*: 47, 236-241.

Jackson, D., Volper, O.V., Bouck, N., y Linzer, D. (1994). Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science*: 266, 1581-1584.

Jakeman, L.B., Winer, J., Bennett, G.L., Altar, A., y Ferrara, N. (1992). Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J. Clin. Inv.*: 89, 244-253.

Kandel, E., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (1991). Principles of neural science. Third edition, Ed. Elsevier.

Koyama, N., Watanabe, S., Tezuka, M., Morisaki, N., Saito, Y. y Yoshida, S. (1994). Migratory and proliferative effect of platelet derived growth factor in rabbit retinal endothelial cells: evidence of an autocrine pathway of PDGF. *Journal of Cellular Physiology*, 158: 1-6.

Laitinen, L. (1987). *Griffonia simplicifolia* lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochem. J.*: 19, 225-234.

Lebrun, J.J., Ali, S., Goffin, V., Ullrich, A., y Kelly, P.A. (1995). A single phosphotyrosine residue of the prolactin receptor is responsible for activation of gene transcription. *PNAS, USA*: 92, 4031-4035.

Magee, J.C., Stone, A.E., Oldham, K.T., y Guice, K. (1994). Isolation, culture, and characterization of rat lung microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.*: 267, L433-L441.

Mitra, I. (1980). A novel cleaved prolactin in the rat pituitary. *In vivo* mammary mitogenic activity of its N-terminal 16 K moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95: 1760-1767.

Montesano, R., Orci, L. y Vassalli, P. (1983). In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *Journal of Cell Biology*: 47, 1648-1652.

Murata, T., Nakagawa, K., Khalil, A., Ishibashi, T., Inomata, H. y Sueishi, K. (1996). The temporal and spatial vascular endothelial growth factor expression in retinal vasculogenesis of rat neonates. *Lab Inv.*: 74 (1), 68-77.

Nicoll, C.S. (1980). Prolactin: ontogeny and evolution of prolactin's functions. *Federation Proc.*: 39, 2563-2566.

Nielsen-Hamilton, M., Hamilton, R.T. y Alvarez-Azaustre, E. (1987). Relationship between mitogen-regulated protein (MRP) and proliferin (PLF), a member of the prolactin/growth hormone family. *Gene*, 51: 163-170.

Nielsen-Hamilton, M., Jang, Y., Delgado, M., Shim, J.K., Bruns, K., Chiang, Ch., Fang, Y., Parfett, C., Denhardt, D.T. y Hamilton, R.T. (1991). Regulation of th expression of mitogen-regulated protein (MRP; proliferin) and cathepsin L in cultured cells and in the murine placenta. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 77: 115-122.

O' Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, H., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. y Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*: 88, 277-285.

O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H. y Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the supression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*: 79, 315-328.

Pe'er J., Shweiki, D., Itin, A., Hemo, Y., Gnessin, H. y Keshet, E. (1995). Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor in neovascularizing ocular diseases. *Lab. Inv.*: 72, 638-645.

Powell, J.Y., Klaasse, J.M. y Mourik, J. (1992). The uptake and expression of the factor VIII and reporter genes by vascular cells. *FEBS*, 203 (2,3): 173-177.

Richards, R., Brar, A.K., Frank, G.R., Hartman, S.M. y Jikihara, H. (1995). Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of Prolactin and Insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biology of Reproduction*, 52: 609-615.

Risau, W. (1995). Differentiation of endothelium. *The FASEB Journal*: 9, 926-933.

Roth, G.J. (1992). Platelets and blood vessels: the adhesion event. *Immunology today*: 13 (3), 100-105.

Rubin, L.L. (1992). Endothelial cells: adhesion and tight junctions. *Current Opinion in Cell Biology*, 4: 830-833.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

Simorre-Pinatel, V., Guerrin, M., Chollet, P., Penary, M., Clamens, S., Malecaze, F. y Plouet, J. (1994). Vasculotropin-VEGF stimulates retinal capillary endothelial cells through an autocrine pathway. *Inv. Ophthal. Vis. Sci.*: 35 (9), 3393-3400.

Sinha, Y. (1995). Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine reviews*: 16 (3): 354-369.

Su, T. y Gilles, M.C. (1992). A simple method for in vitro culture of human retinal capillary endothelial cells. *Inv. Ophthal. Vis. Sci.*: 33 (10), 2809-2813.

Voest, E.E., Kenyon, B.M., O'Reilly, M.S., Truitt, G., D'Amato, R.J., y Folkman, J. (1995). Inhibition of angiogenesis *in vivo* by interleukin 12. *J. Natl. Cancer Inst.*: 87, 581-586.

Yoshitomi, K., y Boorman, G.A. (1990). Eye and associated glands, en Pathology of the Fischer rat, De. Academic Press, 239-260.